

Biogáz fermentáló rendszerek hatékonyságának mikrobiológiai fokozása

Doktori értekezés

Bagi Zoltán

Témavezető:

Prof. Kovács L. Kornél

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

Szeged
2008

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1. A biogáz fermentációban szerepet játszó mikrobák.....	11
2.1.1. Hidrolizáló baktériumok	12
2.1.2. Savképző mikrobák	12
2.1.3. Metanogén mikrobák.....	12
2.1.4. Szulfát redukáló baktériumok	14
2.2. Az anaerob fermentáció lebontási lépései	15
2.2.1. Hidrolízis	17
2.2.2. Savképző szakasz	18
2.2.3. Metanogenezis.....	18
2.2.4. A komplex szerves vegyületek lebontásának összefoglalása.....	22
2.3. A biogáz fermentáció során keletkező termékek felhasználása	26
3. CÉLKITŰZÉS.....	27
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	28
4.1. Tápoldatok, táptalajok.....	28
4.1.1. <i>Escherichia coli</i> (DH5 α , MC4100, DHP-F) táptalaja	28
4.1.2. <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> tápoldata	28
4.1.3. <i>Enterobacter cloacae</i> tápoldata (DSM1)	29
4.2. Mikroorganizmusok	29
4.2.1. <i>Escherichia coli</i> DH5 α és MC4100, DHP-F.....	29
4.2.2. <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (DSM8903).....	29
4.2.3. <i>Enterobacter cloacae</i> (DSM 16657)	30
4.2.4. Kevert természetes kultúra (oltóiszap).....	30
4.3. Az alkalmazott fermentációs technológia	30
4.3.1. Batch fermentáció	30
4.3.2. Folyamatos üzemű fermentáció	32
4.4. Szárazanyag tartalom meghatározás	33
4.5. Szervesanyag tartalom meghatározás.....	33
4.6. Összes széntartalom, szerves széntartalom, összes nitrogén tartalom meghatározás	33
4.7. Szubsztrát biomasszák.....	33
4.8. DNS izolálás.....	34

4.9. Polimeráz láncreakció (PCR)	34
4.9.1. A <i>C. saccharolyticus</i> azonosítása sertés hígrágyából PCR reakció segítségével.....	34
4.9.2. A <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> sejtek DNS-ének mennyiségi meghatározása szennyvíziszapból Real Time PCR segítségével.....	35
4.10. Ecetsav mennyiségi meghatározása	36
4.11. Biogáz minőségi összetételének vizsgálata	36
4.12. pH meghatározás	36
4.13. Sűrűség meghatározás	36
4.14. Ammónium-ion tartalom meghatározás	36
5. Eredmények.....	37
5.1. A biogáz fermentáció mikrobiológiai intenzifikálási lehetősége	37
5.1.1. A hidrogén pozitív hatásának vizsgálata a biogáz fermentáció során detektált gázhozamokra.....	37
5.1.2. HypF <i>E. coli</i> mutáns alkalmazása a biogáz fermentorban	39
5.1.3. Az ecetsav hatása a biogáz fermentációra	40
5.1.4. A hidrogén termelő törzs leoltási arányának hatása a fermentációra	41
5.1.5. Ipari tápoldatok a hidrogén termelő törzsek számára.....	43
5.2. Batch üzemű biogáz fermentációs mérések	46
5.2.1. Szubsztrát biomassa.....	46
5.2.2. Batch üzemű fermentációk mezofil hőmérsékleten	49
5.2.3. Batch üzemű fermentációk termofil hőmérsékleten.....	53
5.3. Folyamatos üzemű biogáz fermentációs mérések	55
5.3.1. Folyamatos üzemű fermentációk mezofil hőmérsékleten	56
5.3.2. Folyamatos üzemű fermentációk termofil hőmérsékleten	59
5.3.3. <i>C. saccharolyticus</i> sejtek mennyiségének nyomonkövetése a fermentáció során	62
5.4. Léptéknövelő kísérletek	63
5.4.1. Biogáz fermentáció 5m ³ -es térfogatban	63
5.4.2. Hidrogén termelő törzs azonosítása a fermentációs maradékban	64
6. Összefoglalás.....	66
Köszönetnyilvánítás	70
A Ph.D dolgozat összefoglalása	77
Summary of the Ph.D. Thesis.....	80
Mellékletek.....	83

Ábrajegyzék

1. ábra: Az anyagcsere aktivitás a redox potenciál függvényében.....	11
2. ábra: Metanogén mikrobák.....	13
3. ábra: Metanogén mikrobák optimális növekedési hőmérséklete	14
4. ábra: Az anaerob lebontási útvonal	16
5. ábra: A biogáz fermentáció mikrobiológiai összefoglalása	17
6. ábra: A metanogén törzsek hidrogén-oxidációs tevékenységének reakcióútja	21
7. ábra: A szénhidrátok lebontásának biokémiája	22
8. ábra A szénhidrátok lebontásának reakcióegyenletei.....	23
9. ábra: A zsírok lebontásának biokémiája.....	23
10. ábra: A zsírok lebontásának reakcióegyenletei	24
11. ábra: A fehérjék lebontásának biokémiája	25
12. ábra: A fehérjék lebontásának reakcióegyenletei	25
13. ábra: Batch fermentáció	31
14. ábra: 5 literes folyamatos üzemű fermentorok sematikus felépítése.....	32
15. ábra: Sejtek közötti hidrogén átadás fontossága a biogáz fermentációban (<i>Enterobacter cloacae</i>)	38
16. ábra: A sejtek közötti hidrogén átadás fontossága a biogáz fermentációban (<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>)	39
17. ábra: A hidrogén szerepe a megnövekedett gázhozamokban.....	40
18. ábra: Na-acetát adagolása a biogáz fermentorokhoz.....	41
19. ábra: Biogáz képződés különböző koncentrációban leoltott hidrogén termelő törzs esetén	42
20. ábra: <i>Enterobacter cloacae</i> növesztése különböző tápoldatokon	43
21. ábra: A <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> növesztésére használt tápoldatok.....	44
22. ábra: <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> növesztése különböző tápoldatokon	45
23. ábra: <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> tenyésztése monokomponensű tápoldatokon	46
24. ábra: A kísérletek során alkalmazott szubsztrát biomasszáék C/N aránya	47
25. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok mezofil hőmérsékleten.	50
26. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált biomassza lebomlás arányok mezofil hőmérsékleten.....	52

27. ábra: Batch fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált többlet biogáz hozamok és szervesanyag lebomlási arányok mezofil hőmérsékleten	52
28. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok termofil hőmérsékleten	53
29. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált szervesanyag lebomlási arányok termofil hőmérsékleten.....	54
30. ábra: Batch fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált többlet biogáz hozamok és szervesanyag lebomlási arányok termofil hőmérsékleten	55
31. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok mezofil hőmérsékleten.....	56
32. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált többlet biogáz hozamok mezofil hőmérsékleten	57
33. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált ecetsav koncentráció változások mezofil hőmérsékleten	58
34. ábra: Folyamatos fermentáció során detektált szervesanyag lebomlási arányok mezofil hőmérsékleten.....	59
35. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok termofil hőmérsékleten.....	60
36. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált átlagos többlet napi biogáz hozamok termofil hőmérsékleten	60
37. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált ecetsav koncentráció változások termofil hőmérsékleten.....	61
38. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált szervesanyag lebomlási arányok termofil hőmérsékleten.....	61
39. ábra: Hidrogén termelő törzs mennyiségének alakulása folyamatos üzemű fermentáció során	62
40. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció 5m ³ -es térfogatban	64
41. ábra: <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> azonosítása a fermentációs maradékban.....	65
1. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai mezofil hőmérsékleten (kontroll).....	84
2. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai mezofil hőmérsékleten (hidrogén termelő törzzsel)	85
3. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai termofil hőmérsékleten (kontroll).....	86
4. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai termofil hőmérsékleten (hidrogén termelő törzzsel)	87
5. melléklet: Folyamatos üzemű fermentációk gázhozamai mezofil hőmérsékleten.....	88

6. melléklet: Folyamatos üzemű fermentációk gázhozam értékei termofil hőmérsékleten 89

1. Bevezetés

Talán már közhelynek is beillenek a következő sorok, de mindenestre tény, hogy az emberiségnek egy jelentős problémával kell belátható időn belül szembenéznie, ami a fosszilis energiakészleteink kimerülése. A mai adatok szerint energiafelhasználásunk 80%-át teszik ki (Omer 2006) a meg nem újuló energiaforrások (földgáz, kőolaj és szén). Az energiafelhasználás növekedésért egyaránt felelős a népesség gyarapodása, valamint az egyre nagyobb ipari igények. A jelen tendencia mellett 30-40 év múlva ugyanezeket az energiahordozókat használva nem lesz képes kielégíteni a termelés a fogyasztók igényét. Már évek óta foglalkoztatja a kutatókat a jelenleg fennálló helyzet, mely szerint a növekvő energiaigények mellett szükségünk lesz alternatív, megújuló energiaforrásokra. Széleskörű kutatások folynak (Beneman 2000, Bálint, és mtsai. 2005, Sharma, Singh és Upadhyay 2008, Yadvika, Sreekrishnan, és mtsai. 2004), amelyek végcélja lehet a biohidrogén, a biodízel, a bioetanol, vagy a biogáz előállítása. Minden esetben azonban kritérium, hogy a keletkezett energia teljes mértékben megújuló forrásból származzon, ami azt jelenti, hogy az alkalmazott alapanyag a felhasználás mértékében újratermelődik. Ezen energiahordozók használata nemcsak a károsanyag kibocsátást csökkentené, hanem egyúttal eleget tehetünk az Európai Unió Magyarországgal szembeni elvárásainak, melynek értelmében a mai 3%-os megújuló energiaforrás felhasználást 12%-ra kell emelni 2020-ra.

A fő probléma jelenleg a megújuló energiaforrásokkal, hogy a gazdaságosság területén nehezen veszik fel a versenyt a ma használatos fosszilis energiahordozókkal szemben. Legkézenfekvőbb példa erre a napenergia közvetlen hőforrásként való használata. A mai napkollektorok kis hatásfokkal rendelkeznek (Celik, Muneer és Clarke 2008), és felszerelésük nagy költséget jelent egy hétköznapi háztartásnak. Bár hosszabb távon megérné az alkalmazása, hazánkban nincsen olyan hitelkonstrukció - külföldi fejlett országokkal ellentétben - amely az ilyen berendezések vásárlását segítené. Széles körben használt megújuló energiahordozó a biomassa (Bai, Lakner, és mtsai. 2002). Biológiai folyamatokban átalakított szervesanyagok összességéről beszélünk, ami általában felosztható növényi, állati és humán eredetű biomasszára. Növényi eredetű biomassa lehet például a fa is ugyanúgy, mint kukoricaszár, vagy a különböző energianövények. Állati eredetű biomasszának is számos típusával találkozhatunk, mint a különféle ipari melléktermékek, a tejipari hulladékok, és a hígtrágyák. Kommunális eredetű biomassa az egyszerű szeméttelapi hulladék, valamint a szennyvíziszap.

A legegyszerűbb, és ezért a legelterjedtebb eljárás a biomassza hasznosítására az, ha elégetjük. Egyszerűen megvalósítható, nem igényel komolyabb ipari felkészültséget, azonban az égéstermékek ártalmasak a környezetre (Yin, Rosendhal és Kaer 2008), és az elégetés hatásfoka alacsony. Más módszerek is ismertek, a szerves hulladék természetétől függően. Ennek megfelelően komposztálhatjuk, a biomassza speciális elemeiből (repce, napraforgómag) biodízel gyárthatunk, számos kutatás foglalkozik bioetanol gyártással (Omer 2006), és már hazánkban is üzemelnek olyan tömegközlekedési eszközök, melynek kizárólagos hajtóanyaga a bioetanol.

A dolgozat szempontjából legfontosabb hasznosítási mód a biogáz termelés. A biogáz anaerob fermentáció során keletkezik (Bai 2007). A keletkező termékek sokrétűen felhasználhatóak, hiszen a biogázt elégethetjük, mellyel egyszerre kapunk hőt és elektromos energiát, vagy tisztítást követően üzemanyagként használhatjuk, illetve a keletkező fermentmaradék alkalmazható műtrágya kiváltására (Bai 2007, Gerardi 2003). A biogáz fermentáció során feldolgozott biomassza lehet növényi anyag, vagy a tápláléklánc mellékterméke, állati vagy kommunális hulladék, ürülék. A hulladékok pontos kémiai összetétele nem ismert, általánosságban azonban elmondható, hogy a növényi anyagok fő alkotója a cellulóz, különböző hemicellulózok, összetett és egyszerű cukrok. A növényi eredetű anyagok kisebb, míg az állati eredetűek nagyobb arányban tartalmaznak különböző fehérjéket, peptideket, zsírokat és olajokat. E főalkotókhoz képest kis mennyiségben található bonyolultabb kémiai összetételű heterociklusos vegyületek, vitaminok, hormonok, és a fő alkotók lebomlásakor keletkező egyszerű szerves vegyületek (szerves savak, aldehidek, zsírok, cukrok). A biogáz előállítás alapanyagául tehát összetett vegyületek szolgálnak, a lebontás kémiai folyamatainak leírásakor így nagyban általánosítanunk kell (Alexander 1985).

A biogáz képződési folyamat csak anaerob körülmények között zajlik le, azonban a fermentatív szakasz mikrobái között léteznek fakultatív anaerobok is (Winter 1984). A lebontás során a biokémiai folyamatokat az erjesztésre kerülő anyag összetételétől, minőségétől függően meghatározott mikroorganizmusok segítségével lehet végrehajtani. A baktériumok tevékenysége szigorú rendben követi egymást, minden lépést más speciális mikroszervezet hajt végre. A különböző típusú mikrobák egymásra utaltak és egymással összehangoltan működnek, egy-egy specializált törzs csak meghatározott molekulatípusokat dolgoz fel (Winter 1984). A komplex nagy szerves molekulák metánná történő átalakítása csak akkor lehet sikeres, ha kialakul a baktériumok speciális közössége, amelyben mindegyik faj meg tud élni, hátrahagyva egy olyan terméket, amelyet a következő baktérium csoport

hasznosítani tud. A nagy szerves láncmolekulák megbontásával nagy mennyiségű energiát nyerhetnek a mikroszervezetek, melyért először több baktérium faj verseng. A versengésből győztesen kikerülő faj dominánssá válik. A lebomlás során egyszerűbb vegyületek jönnek létre, ezek energiatartalma is alacsonyabb így már kevesebb baktérium törzs számára nyújt táplálékforrást. A folyamat végén már csak a metanogének számára lesz hasznosítható, elegendő energiatartalmú a keletkező intermedier (Gerardi 2003).

Három fő mikroba csoport játszik szerepet az anaerob lebontási folyamatban, melyek a polimerbontó baktériumok, az acetogén baktériumok, valamint a metanogén törzsek (Thiele és Zeikus 1988). A polimerbontó törzsek támadják meg a nagymolekulájú szerves vegyületeket extracelluláris enzimeik segítségével, melynek eredményeként oligomer és monomer köztitermékek keletkeznek. Az acetogének elsősorban a cukrokat és oligoszacharidokat hasznosítják, az anyagcsere folyamataik eredményeként szerves savak keletkeznek, mint ecetsav, piroszölősav, hangyasav, propionsav, valamint szén-dioxid. Más acetogén törzsek képesek felhasználni ezeket a szerves savakat például etanolt, hidrogént és szén-dioxidot termelve. A fermentációs folyamat utolsó csoportjaként szereplő metanogén törzsek a szerves savak, hidrogén és szén-dioxid felhasználásával metánt produkálnak.

Biogáz fermentáció termodinamikailag csak abban az esetben mehet végbe, ha a hidrogén koncentrációja a rendszerben a küszöbérték alatti, ezért hidrogén a biogázban igen kis mennyiségben van jelen. Ezzel ellentétben a metanogén törzsek redox reakcióihoz nélkülözhetetlen a megfelelő hidrogén utánpótlás. Az anaerob lebontási folyamatokban szerepet játszó mikrobák közötti szintropikus együttműködés pontos megismerése igen fontos előnyt jelent a biodegradáció folyamatának megértésében (Bryant, és mtsai. 1967, Wolin 1975, Conrad, Bonjour és Aragno 1985, Schmidt és Ahring 1993). A metanogén és acetogén törzsek szintropikus kölcsönhatásban állnak egymással, mely a sejtek közötti hidrogén transzfer révén valósul meg (Wolin 1975, Conrad, Bonjour és Aragno 1985, Thiele és Zeikus 1988, Cayol, és mtsai. 2002).

A biogáz képződés spontán is lejátszódik mocsarakban, hulladéktároló telepeken, ahol kialakulhatnak anaerob mikroklímák, mesterséges beavatkozással viszont szignifikánsan növelhető a gáztermelés (Grant és Long 1981, Bai 2007, Kaltwasser 1983, Kissné 1983).

A biogáz legnagyobb hányadát (55-75%) a metángáz teszi ki, ezen kívül 28-48% szén-dioxidot és 1-2% egyéb gázt, kénhidrogént, szén-monoxidot és nitrogént tartalmaz (Gerardi 2003, Bai 2007). A földgáz több, mint 90%-a metán, ez részarányától függően a földgáz fűtőértékének 70%-át teszi ki. Ezt az értéket a biogáz esetén is elérhetjük, a szén-dioxid

eltávolításával, illetve sűrítéssel. A tisztítás után a biogáz, a földgázzal gyakorlatilag megegyező fűtőértéket képvisel (Bai 2007).

Legmagasabb metántartalma a szennyvíziszapból erjesztett biogáznak van (60-75%), ezt követi a sertés hígtrágyából nyerhető, majd a mezőgazdasági melléktermékekből, végül pedig a szilárd települési hulladékból nyerhető gáz metántartalma.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A biogáz fermentációban szerepet játszó mikrobák

A biogáz fermentációért számos mikroba törzs felelős. A folyamatban résztvevő mikrobáknak oxigén érzékenysége alapján két csoportot különböztetünk meg, a fakultatív anaerob és obligát anaerob mikroorganizmusokat (Bai 2007, Gerardi 2003). Az anaerob törzsek akkor képesek a rendelkezésükre álló szubsztrátot a leghatékonyabban hasznosítani, ha a közeg redox potenciálja -200 és -400mV közé esik (Zehnder 1988). A biogáz fermentorba bekerülő oxigén ezt jelentősen növelheti, és az ott lezajló mindhárom fő folyamatot (hidrolízis, savképző szakasz, metanogenezis) gátolja (1. ábra).

redox potenciál (mV)	hordozó molekula a szerves vegyületek bontásakor	közeg típusa	respiráció típusa
$>+50$	oxigén	aerob	aerob
$+50 - -50$	nitrit, nitrát	anarob	anoxikus
<-50	szulfát	anarob	fermentáció (szulfát redukáló)
<-100	szerves komponens	anarob	fermentáció (kevert szerves sav képződés)
<-300	szén-dioxid	anarob	fermentáció (metán képződés)

1. ábra: Az anyagcsere aktivitás a redox potenciál függvényében

Ha a redox potenciál $+50$ és -50mV között változik szabad molekuláris oxigén nincs a rendszerben, de nitrit és nitrát ionok segítségével lehetővé válik a szerves komponensek lebontása. Ha értéke $\leq -50\text{mV}$ nitrit és nitrát ionok nem hasznosíthatóak, azonban szulfát ionok rendelkezése állnak. Szerves vegyületek szulfát segítségével történő lebontása során hidrogén-szulfid keletkezik különböző savak és alkoholok mellett (Zehnder 1988). Amennyiben a redox potenciál -100mV alatti egyéb szerves molekulák szükségesek a szubsztrát biotomassza lebontásához. A folyamat során egyes komponensek oxidálódnak, míg más komponensek redukálódnak. Melléktermékként különböző szerves savak (hangyasav, ecetsav, propionsav, vajsav) keletkeznek, ezért a folyamatot kevert savas fermentációnak is nevezik. -300mV alatt egyszerű vegyületek (szén-dioxid, hidrogén) konvertálódnak metánná (Gerardi 2003).

2.1.1. Hidrolizáló baktériumok

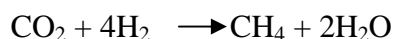
A bakteriális enzimek működési helye alapján két típust szokás megkülönböztetni: exoenzimek és endoenzimek. Az exoenzimek aktív transzport mechanizmusok segítségével a sejten kívüli térbe jutnak, katalitikus aktivitásukat ott fejtik ki. A nagymolekulájú szerves vegyületeket hasítják, a kis molekulatömegű termékeket a sejtek már képesek felvenni. Itt endoenzimek segítségével további átalakításon mennek keresztül. A különböző törzsek csak bizonyos típusú exoenzimek előállítását végzik, mely azt jelenti, hogy igen gazdag mikroba populáció szükséges a sokféle molekulából összetett biomassa megfelelő hatékonyságú lebontásához (Warren 1996).

Egy jól működő biogáz reaktorban a mikrobák száma közel 10^7 sejt/ml, megtalálhatóak szacharolitikus, proteolitikus, lipolitikus törzsek, valamint metanogén mikrobák (Gerardi 2003).

2.1.2. Savképző mikrobák

A hidrolizáló törzsek fermentációs termékeit a savképző (acetogén) törzsek alakítják tovább főként ecetsavvá és hidrogénné. Lassan és csak nagyon alacsony hidrogén koncentráció mellett képesek szaporodni. Jelentőségük, hogy a hidrogénben gazdag vegyületeket (pl. etanol tejsav, vajsav) a metanogének számára előkészítik ecetsav és H_2 formájában (Gottschalk 1979).

A savképző törzsek a metanogén mikrobákkal szimbiotikus kapcsolatban állnak. Az acetogének által előállított ecetsavat a metanogének szubsztrátként használják fel. A savképző törzsek működésének eredményeként hidrogén is képződik, mely felhalmozódása a reaktorban károsan hat a biogáz képződésre, az acetogén törzsek aktivitása csökken (termékgátlás). A metanogén törzsek felelősek az itt képződő hidrogén eltávolításáért (Gerardi 2003).



2.1.3. Metanogén mikrobák

A metanogén mikrobák a legősibb élőlények közé tartoznak, rendszertanilag az Archaeobacteriumokhoz tartoznak. Számos olyan tulajdonságuk ismert, mely nem jellemző az

Eubacteria törzsekre. Van sejtfaluk, csak nem olyan összetételű, mint a baktériumoknak, egyedi a membrán lipid összetételük, valamint speciális koenzimeik vannak. A sejtfal nem tartalmaz mureinsavat, helyette koenzimM, koenzim F₄₂₀ és F₄₃₀ vesz részt a felépítésében, melyek csak a metanogénekre jellemzőek (Reeve 1992, Zeikus 1977). Tipikusan igen magas kéntartalommal rendelkeznek, a sejtek száraz tömegének közel 2,5%-a kén. Oxigénre érzékenyek, természetes körülmények között a talajban, vízi környezetben, valamint állatok emésztő szervrendszerében fordulnak elő, például a kérődzők összetett gyomrában. Az összetett gyomor egy speciális szerv, ahol a cellulóz és a komplex poliszacharidok lebontása történik. A kérődző állatok metanogének nélkül életképtelenek lennének. Energiát egyszerű vegyületek (szén-dioxid, ecetsav) redukálása segítségével nyernek, néhány törzs képes molekuláris nitrogén fixálására (Gottschalk 1979).

A metanogének rendszerezése a felépítésük, szubsztrát felhasználásuk, enzimeik, valamint növekedési hőmérsékletük alapján történik (Reeve 1992). Ennek alapján a körülbelül 50 törzset 3 osztályba és 4 családba soroljuk (2. ábra).

Osztály	Család
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceases</i>
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceas</i>
	<i>Methanosarcinaceae</i>

2. ábra: Metanogén mikrobák

A metanogén törzsek obligát anaerob élőlények. Az anaerobicitást jellemezni lehet a redox potenciál értékkel, amennyiben ez -300mV-nál alacsonyabb a feltételek megfelelőek a metanogének számára (Mertoglu, és mtsai. 2006).

A metanogének reprodukciós ideje az Eubacteria fajokhoz viszonyítva hosszú, 3-50 nap között változik a hőmérséklettől függően (Zaikus 1977), ezért az anaerob fermentorokban hosszú retenciós időt kell alkalmazni. Minimálisan 12 nap javasolt, ekkor a metanogén törzsek már képesek állandó sejtszámot tartani a reaktorban. Optimális szaporodási hőmérséklet alapján megkülönböztetünk mezofil és termofil metanogéneket (Rastogi, és mtsai. 2007), melyek növekedési optimuma 30-37°C és 50-90°C (3. ábra).

Genus	növekedési hőmérséklet (°C)
<i>Methanobacterium</i>	37-45
<i>Methanobrevibacter</i>	37-40
<i>Methanosphaera</i>	35-40
<i>Methanococcus</i>	35-90
<i>Methanocorpusculum</i>	30-40
<i>Methanocellus</i>	35-40
<i>Methanogenium</i>	20-40
<i>Methanoplanus</i>	30-40
<i>Methanospirillum</i>	35-40
<i>Methanococcoides</i>	30-35
<i>Methanohalobium</i>	50-55
<i>Methanohalophilus</i>	35-45
<i>Methanolobus</i>	35-40
<i>Methanosarcina</i>	30-40
<i>Methanotrix</i>	35-50
<i>Thermococcus</i>	80-90
<i>Methanothermococcus</i>	70-90
<i>Methanothermus</i>	83-88

3. ábra: Metanogén mikrobák optimális növekedési hőmérséklete

Metanogén mikrobákat tiszta kultúrában igen nehéz növesztetni, a hagyományos laboratóriumi technikák nehezen alkalmazhatóak. Ennek oka egyrészt, hogy obligát anaerobok, vagyis kis mennyiségű oxigén hatására nagyon rövid idő alatt elpusztulnak, másrészt a hasznosítható szubsztrátok alacsony száma.

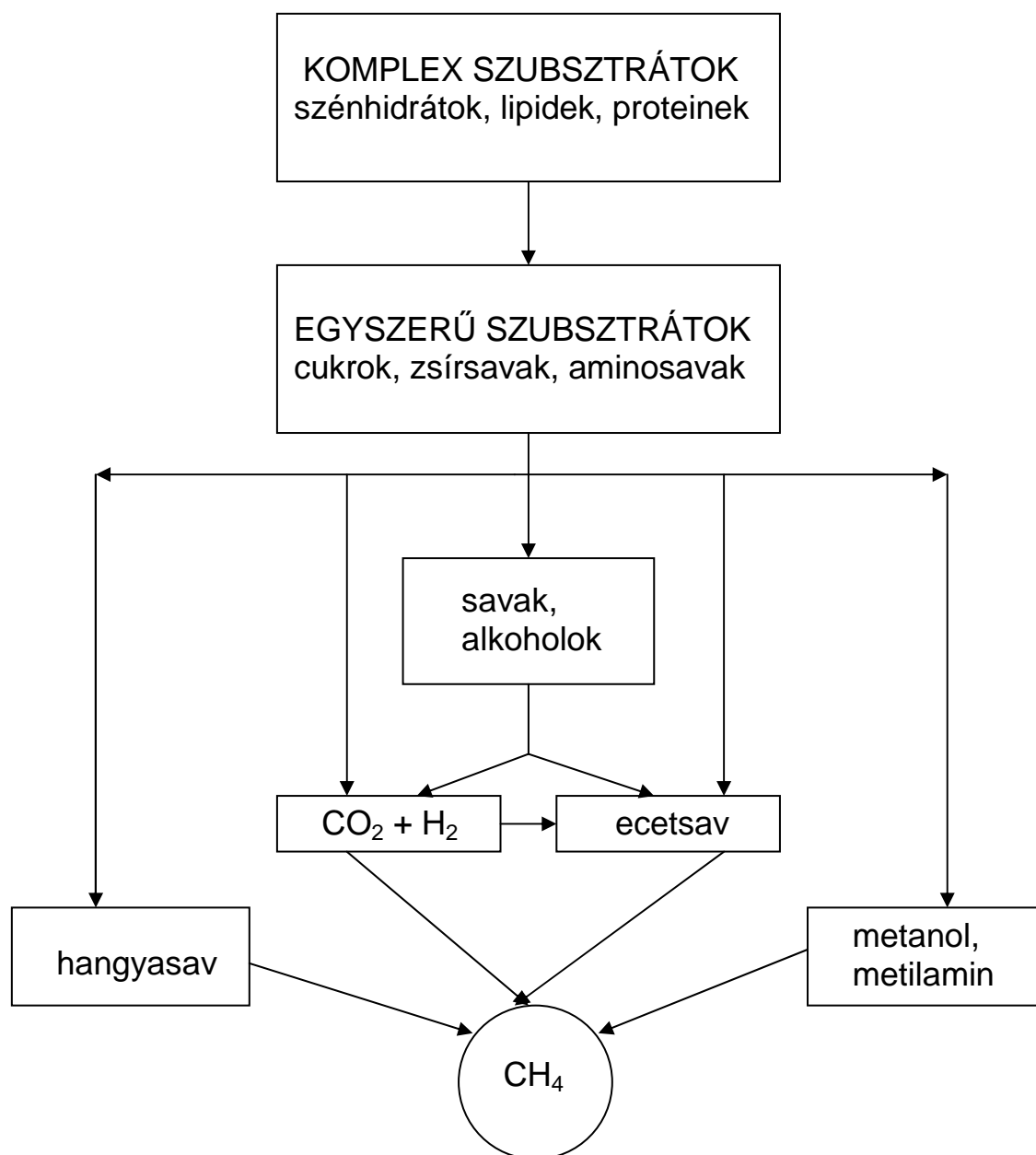
2.1.4. Szulfát redukáló baktériumok

Amennyiben a szulfát koncentráció megemelkedik az anaerob reaktorban a szulfát redukáló törzsek elszaporodnak (pl.: *Desulfovibrio desulfuricans*). Növekedésükhöz, csakúgy mint a metanogéneknek hidrogénre van szükség, hidrogén-szulfidot állítanak elő (Cappenburg 1975). Mivel mind a metanogén, mind a szulfát redukáló törzseknek hidrogénre van szükségük anyagcsere folyamataik fenntartásához versengés, kompetíció alakul ki a két mikroba típus között. Alacsony ecetsav szint esetében a szulfát redukáló törzsek kerülnek

előnybe, ekkor az anaerob fermentorban a hidrogén-szulfid szint megemelkedik, amely korrozív tulajdonsága mellett gátolja mind a savképző, mind a metanogén mikrobák szaporodását.

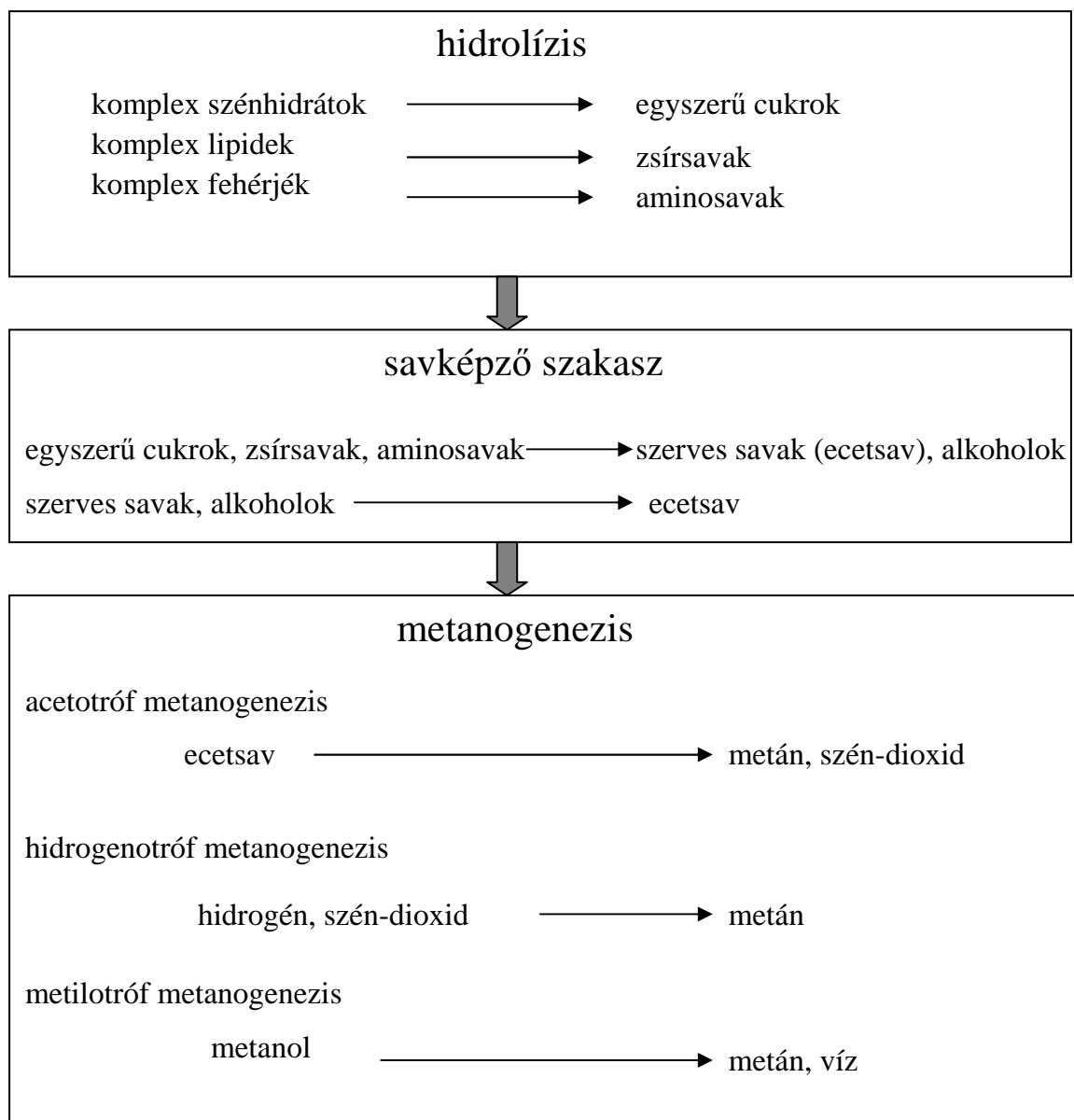
2.2. Az anaerob fermentáció lebontási lépései

Az alábbiakban a biogáz képződésben szerepet játszó összetett szerves vegyületek lebontási útvonalait mutatom be. A természetben élő különböző baktérium törzsek egy csoportja az oldhatatlan nagymolekulájú szerves vegyületeket hasznosítja, egyszerűbb oldható vegyületekké alakítják át (Alexander 1985). A mikrobák más csoportjai ezen vegyületeket anyagcsere folyamataik során tovább alakítják egyéb intermedierekké, melyek további baktérium törzsek számára szolgálnak tápanyag forrásként. A lebontás egyes lépései közben a molekulákban tárolt kötések felbontása révén energia szabadul fel, mely a mikrobák növekedésekor, szaporodásakor hasznosul, miközben a molekulák egyre kisebb és egyre inkább redukált formába kerülnek. Az egyes törzsek egy úgynevezett anaerob lebontási láncba szerveződnek, mely egy igen komplex struktúra (Gottschalk 1979). Az anaerob fermentorokban a metán a legkisebb és legredukáltabb szerves komponens (4. ábra).



4. ábra: Az anaerob lebontási útvonal

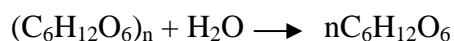
Az anaerob fermentáció során a szubsztrát biomasza lebontásának három lépését különítjük el, melyek a hidrolízis, a savképző szakasz, valamint a metanogenezis (5. ábra).



5. ábra: A biogáz fermentáció mikrobiológiai összefoglalása

2.2.1. Hidrolízis

A cellulóz képződik a legnagyobb mennyiségben a földi biomasszában, mely vízben oldhatatlan, igen sok glükóz monomerből épül fel. Hidrolizálásáért például *Cellulomonas* törzsek felelősek, extracelluláris enzimeik segítségével végzik, mely során számos vízben oldható glükóz egység szabadul fel (Leschine 1995). Ez már könnyen hasznosítható a mikrobák számára.



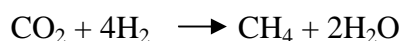
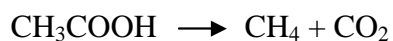
2.2.2. Savképző szakasz

A savképző szakaszban a hidrolízis eredményeként keletkező vízdékony komponensek további degradációja történik fakultatív anaerob és anaerob törzsek segítségével (Zehnder 1988). A folyamat során szén-dioxid, hidrogén, alkoholok, szerves savak, nitrogén tartalmú vegyületek, valamint kéntartalmú komponensek keletkeznek. Az ecetsav fordul elő legnagyobb mennyiségben a szerves savak közül. A szén-dioxid és a hidrogén közvetlenül ecetsavvá és metánná konvertálódik. A nitrogén és kéntartalmú vegyületek megjelenése a fehérjék lebontásának köszönhető. Egyes szerves savak (ecetsav, hangyasav), alkoholok (metanol) és nitrogéntartalmú komponensek (metilamin) azok, melyek közvetlenül felhasználhatóak a metanogén mikrobák számára, míg mások indirekt módon hasznosulnak (etanol, vajsav, propionsav). Az acetát nem csak a szerves vegyületek lebomlása során, hanem az acetogenezis folyamatában is keletkezhetnek, mely a savképző szakaszra jellemző, mikor az egyéb szerves savak (vajsav, propionsav) és alkoholok ecetsavvá alakulnak (Zehnder 1988).

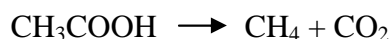
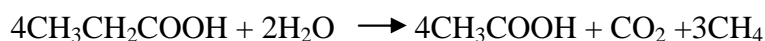
2.2.3. Metanogenezis

A metanogenezis szakaszban metán keletkezik főként ecetsavból, szén-dioxidból és hidrogénből (Zeikus 1977). Ameddig a metanogén és acetogén törzsek sejtszáma egyensúlyban van a fermentorban, addig a szerves savak megfelelően lebomlanak a rendszerben, melyet az enyhén lúgos pH jelez, amit a nitrogéntartalmú komponensekből felszabaduló ammónia okoz. Az ammónia reakcióba lép a vízzel, ez ammóniumot eredményez, mely lúgos pH-t okoz (Alexander 1985).

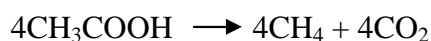
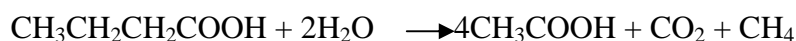
A metanogén mikrobák energiaszükségletüket viszonylag egyszerű felépítésű szerves vegyületek lebontásából fedezik. Ezen szubsztrátok egy (hangyasav, metanol, szén-dioxid, szén-monoxid, metilamin) vagy két szénatomosak (ecetsav). A szén-dioxid terminális elektron akzeptorként funkcionál a szerves vegyületek lebontása során keletkező elektronok számára. Az anaerob fermentorban keletkező metán túlnyomó többsége az ecetsav és a hidrogén felhasználása során keletkezik. Az ecetsav hasítása, valamint a szén-dioxid redukciója eredményeként metán szabadul fel (Zeikus 1977, Reeve 1992).



A propionsav és vajsav fermentációja jóval kevésbé jellemző. A propionsav lebontása két lépésben valósul meg, melyhez két mikroba törzsre van szükség. Az első lépésben a propionsav hasítása eredményeként metán és ecetsav keletkezik egy szerves savképző törzs (*Syntrophobacter wolinii*) és egy metanogén törzs segítségével, majd a második lépésben történik az ecetsav hasítása. A reakció csak akkor megy végbe, ha a hidrogén és hangyasav koncentráció alacsony a közegben, vagyis a metanogén törzsek megfelelően működnek. A propionsav tehát egy kiváló indikátor molekula, ha mennyisége nő az anaerob fermentorban az azt jelenti, hogy stressz érte a mikrobiális rendszert, várható a biogáz fermentáció csökkenése (Zeikus 1977).



A vajsav lebontása szintén két lépésben valósul meg, melyhez szintén két mikroba törzsre van szükség. A vajsav is indikátor molekula, megjelenése nagy mennyiségben a fermentáció nem megfelelő állapotára utal (Zeikus 1977).



Az egyes metanogén törzsek nem képesek az összes szubsztrát típus lebontására, éppen ezért az anaerob fermentorban szükség van számos törzsre a megfelelő biomassa lebontás elérése érdekében. Szubsztrát specificitás szempontjából három fő csoportot lehet megkülönböztetni: hidrogenotróf metanogének, acetotróf metanogének és metilotróf metanogének (Shima, Warkentin, és mtsai. 2002)

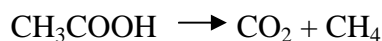
2.2.3.1. Hidrogenotróf metanogenezis

Hidrogént használnak fel a szén-dioxid metánná történő átalakításához. Működésük eredményeként alacsony szinten tartják a reaktorban a hidrogén szintet, mely elengedhetetlen az acetogén törzsek számára (Zeikus 1977, Shima, Warkentin, és mtsai. 2002).



2.2.3.2. Acetotróf metanogenezis

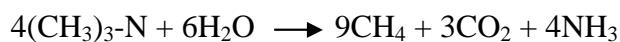
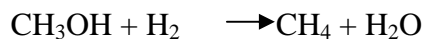
Ezen törzsek hasítják az ecetsavat, mely során metán és szén-dioxid keletkezik. A keletkező szén-dioxid egy részét a hidrogenotróf törzsek tovább alakítják metánná (Zeikus 1977, Shima, Warkentin, és mtsai. 2002).



Az acetotróf törzsek jóval lassabban szaporodnak, mint a hidrogenotróf törzsek, és igen érzékenyek a hidrogén jelenlétére. Így a magas hidrogén szint nem csak az acetogén mikrobák számára gátló tényező, hanem egyes metanogén törzsek számára is (Zeikus 1977).

2.2.3.3 Metilotróf metanogenezis

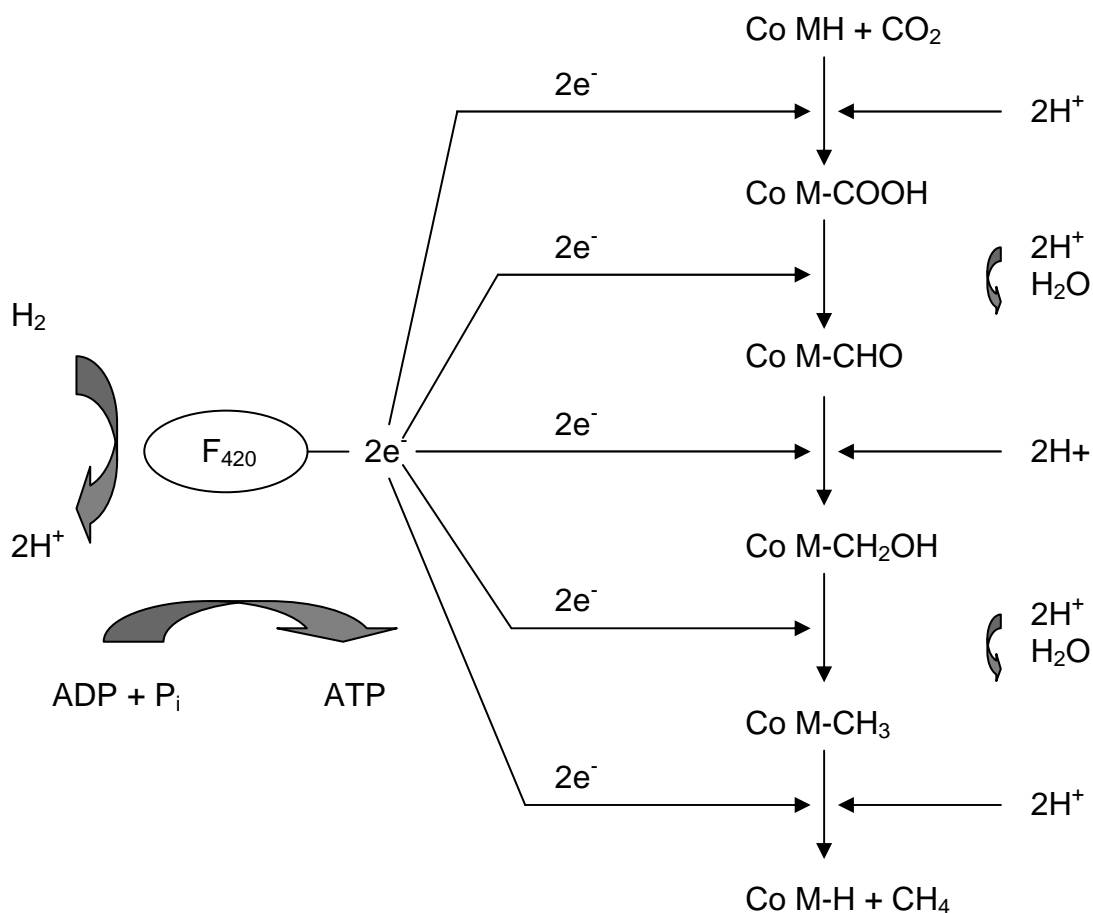
Ezen törzsek olyan szubsztrátokat képesek hasznosítani, melyek rendelkeznek metil csoporttal (metanol, metilamin, stb.). Közvetlenül a metil csoportból állítják elő a metánt, nem a szén-dioxidból (Shima, Warkentin, és mtsai. 2002).



A hidrogén és szén-dioxid felhasználása eredményeként keletkező metán előállítás során a sejtek nagyobb energiamennyiséghez jutnak, mint az ecetsav hasítása segítségével, mégis az anaerob fermentorban a metán közel 70%-a ecetsavból keletkezik. Ennek oka a rendelkezésre álló limitált hidrogén mennyiség. Az ecetsavból előállított metán döntő

többségéért két genus felelős, a *Methanosarcina* és a *Methanothrix* (Gerardi 2003). A metanogén mikrobák lassú szaporodásának oka a biokémiai folyamatok során felszabaduló viszonylag kevés energia, valamint a hasznosított szubsztrátok csekély száma. Nagy mennyiségű szubsztrát lebontására van szükség ahhoz, hogy a sejtek szaporodni tudjanak, megfelelő mennyiségű energia álljon rendelkezésükre, a fermentációs maradékban ezért találunk viszonylag kevés sejtet a nagy mennyiségű bevitt biomasszához képest.

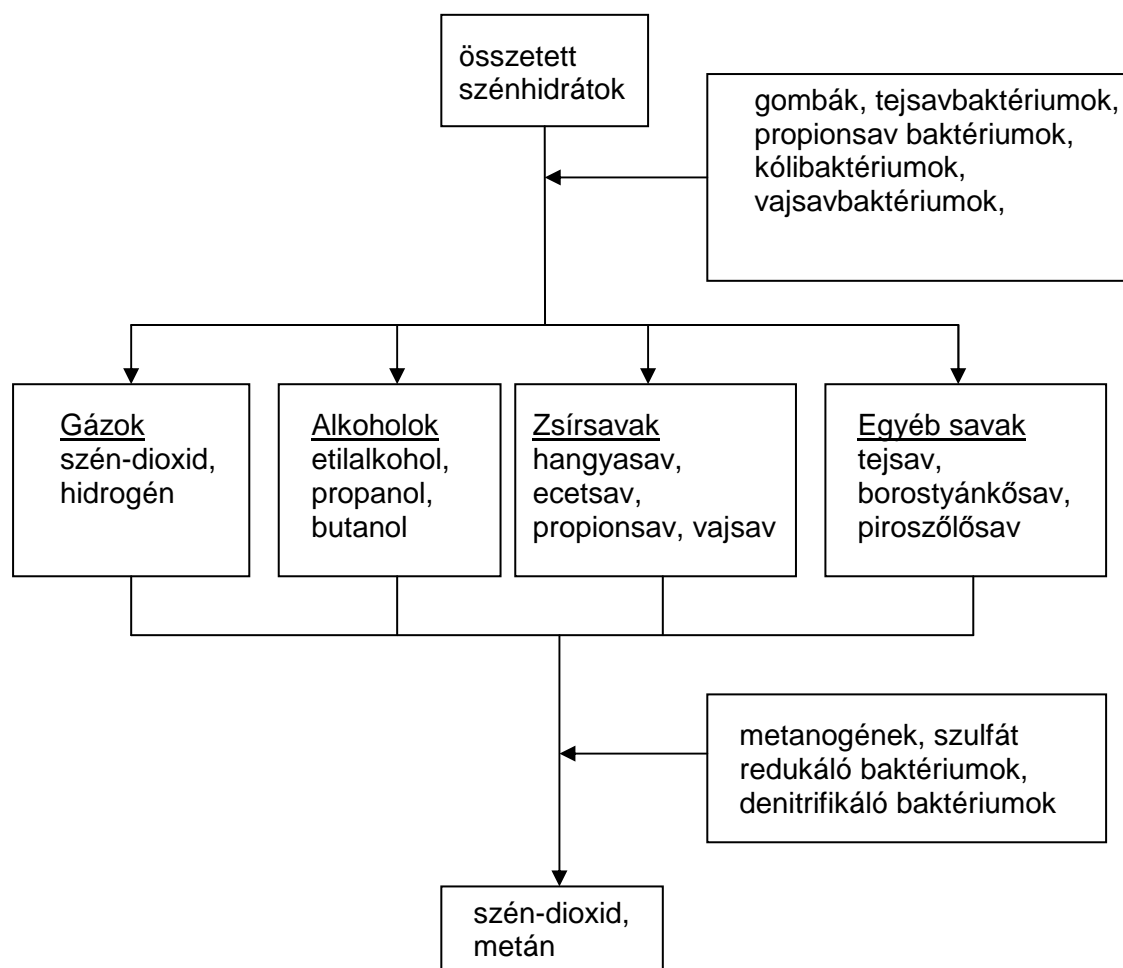
A metanogének hidrogén feldolgozás közben az elektrontranszfer-foszforiláció (6. ábra) révén elveszítik energiájukat (Thauer 1990). A hidrogént oxidálják, nem szabad oxigénnel, hanem a szén-dioxid kötött oxigénjével. E folyamatban két biokémiai komponens játszik kulcsszerepet, az F_{420} és az M koenzim. Az F_{420} egy fluoreszkáló komponens, mely elektrontranszfer elemként működik. Az M-koenzim 2-merkaptó-etanolkénsav, mely mint metiltranszfer ágens szerepel (Reeve 1992).



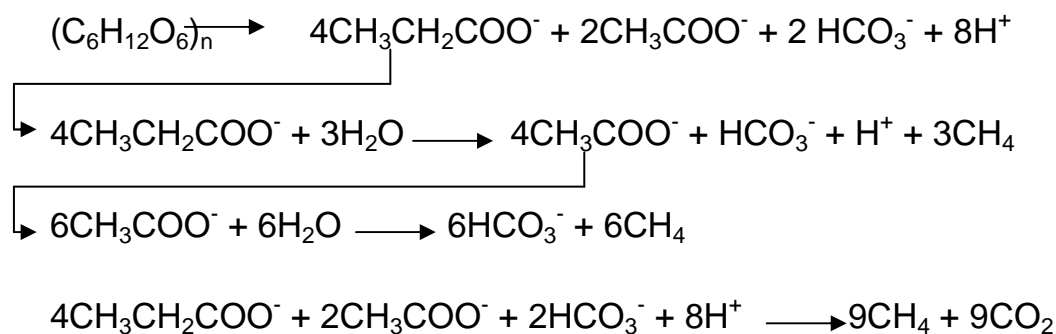
6. ábra: A metanogén törzsek hidrogén-oxidációs tevékenységének reakcióútja

2.2.4. A komplex szerves vegyületek lebontásának összefoglalása

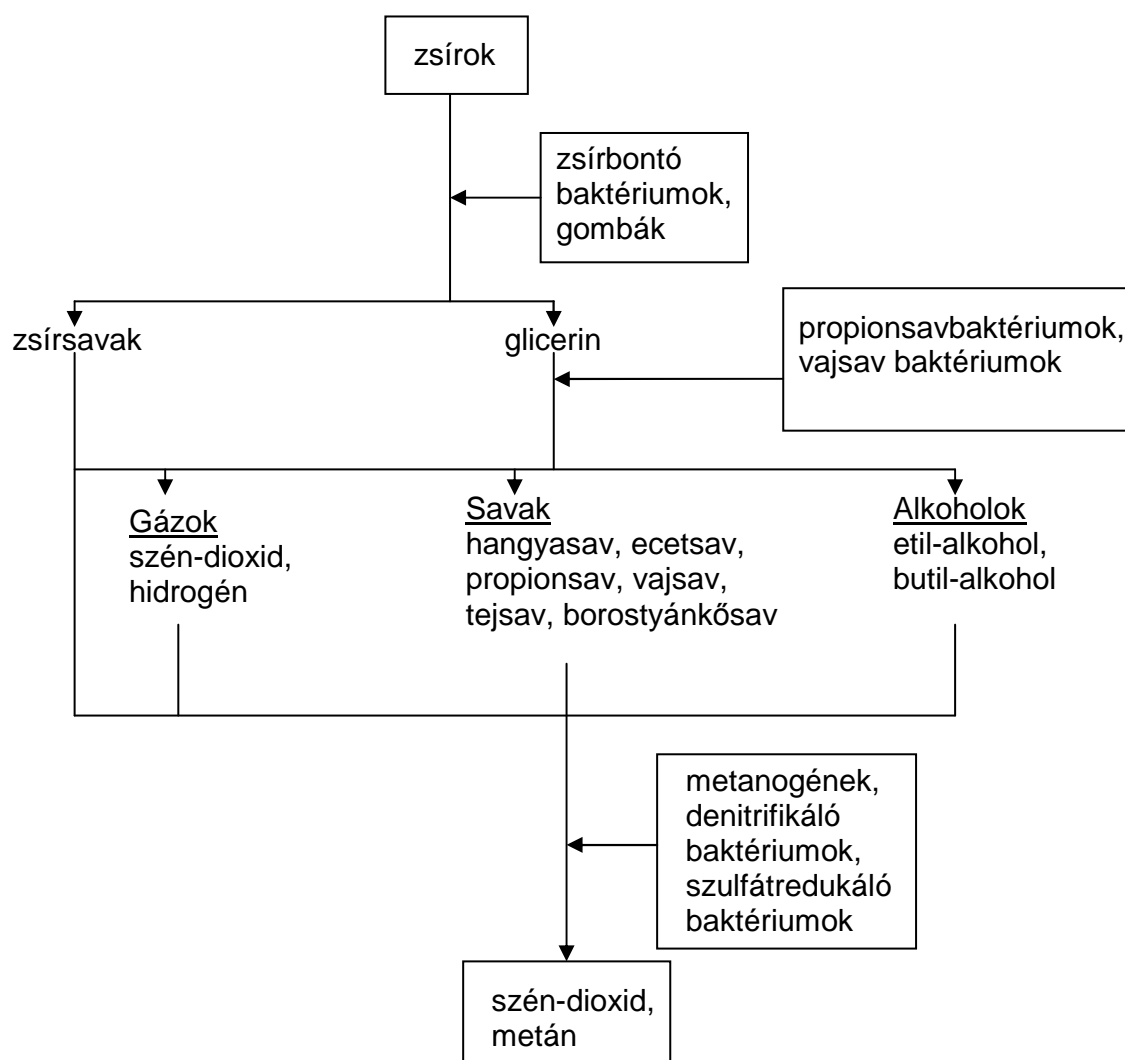
A különböző típusú nagymolekulájú szerves vegyületek lebontási útvonalai a következő ábrákon láthatóak.



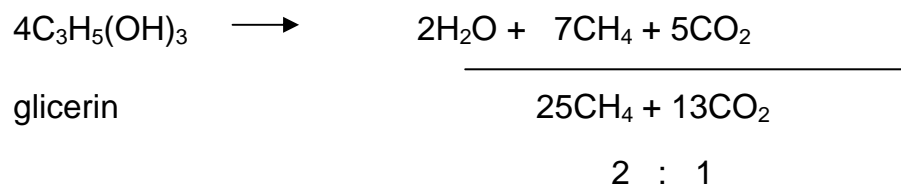
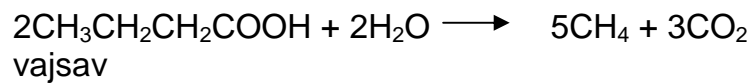
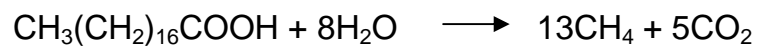
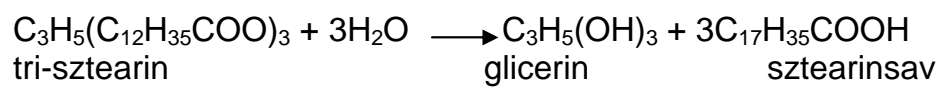
7. ábra: A szénhidrátok lebontásának biokémiája



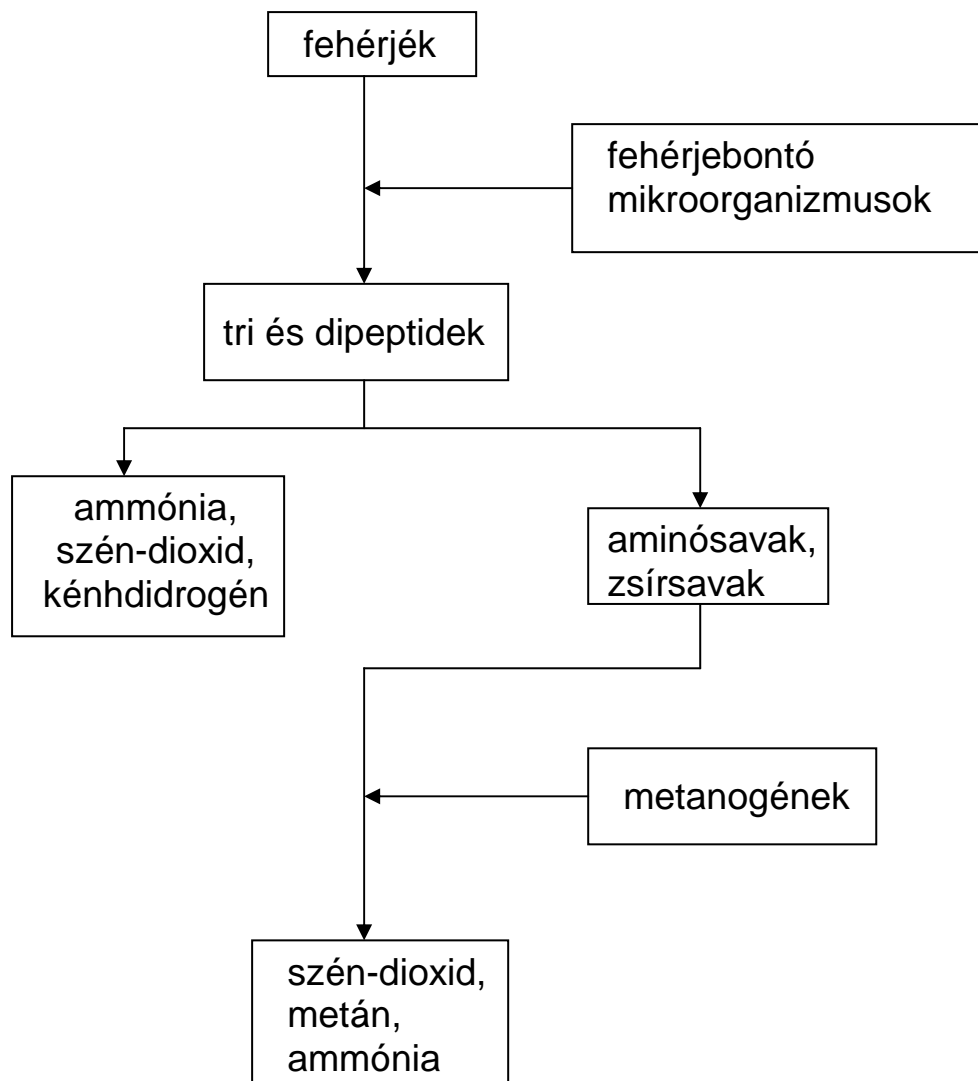
8. ábra A szénhidrátok lebontásának reakcióegyenletei



9. ábra: A zsírok lebontásának biokémiája

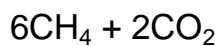
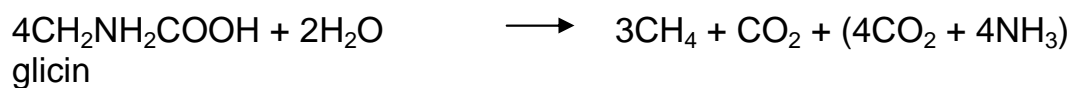


10. ábra: A zsírok lebontásának reakcióegyenletei



11. ábra: A fehérjék lebontásának biokémiája

Fehérje → aminósavak + zsírsavak



3 : 1

12. ábra: A fehérjék lebontásának reakcióegyenletei
(az itt feltüntetett aminosavak megfelelően reprezentálják az összes aminosavat)

A zsírok lebontásának eredményeként a keletkező biogázban a metán és szén-dioxid aránya kb. 2:1, míg a fehérjék esetében ez az arány 3:1. Magas fehérjetartalmú szubsztrát alkalmazásakor tehát a biogáz metán tartalma magasabb, azonban a biomassza tömegéhez képest nagy részarányban nem célszerű alkalmazni, ugyanis ekkor számos nitrogén tartalmú intermedier, illetve végtermék (pl. ammónia) jelenik meg, mely a mikrobiális egyensúlyra károsan hat (Zehnder 1988).

2.3. A biogáz fermentáció során keletkező termékek felhasználása

A biogáz előállítása több szempontból is különleges helyet foglal el a megújuló energiaforrások között. Ez az a biomassza-felhasználási mód, amely a legsokoldalúbb módon elégítheti ki a felhasználók – különösen egy település, vagy egy mezőgazdasági vállalkozás – igényeit, hiszen a folyamatban - közvetlenül, vagy további átalakítás során - többféle termék keletkezik, ezek mindegyike felhasználható (Bai 2007). Ezek a következők:

Helyben történő felhasználásra:

- biogáz: mely hasznosítható fűtésre, hűtésre, gázmotorok meghajtására
- biotrágya: mely a felhasznált szerves trágyánál, illetve kommunális hulladéknál jóval értékesebb
- szén-dioxid: a biogáz tisztításának mellékterméke (üvegházak szén-dioxid trágyázása)

Értékesítésre:

- tisztított biogáz: melynek jellemzői megegyeznek a földgázéval (fűtés, autógáz)
- elektromos áram a biogáz generátorral történő átalakításakor
- dúsított biotrágya virágföldként, illetve humuszképző anyagként, akár biogazdálkodók részére is

3. CÉLKITŰZÉS

Világszerte több tízezer különböző méretű, ipari léptékű biogáz üzem működik. A technológiai fejlesztések arra törekednek, hogy a biomasszát a lehető legnagyobb hatékonysággal alakítsák át biogázzá. Több fizikai, illetve kémiai módszer ismert (Harper és Pohland 1987, James, Chernicharo és Campos 1990, Yadvika, Sreekrishnan, és mtsai. 2004) az egységnyi szubsztrátból történő biogáz kihozatal növelésére, azonban ezek a módszerek gyakran nehézkesek, drágák, vagy nem alkalmazhatóak megbízhatóan. Hatékony biotechnológiai módszerek a kívánt cél elérésére nem ismertek, ezt felismerve határoztuk el, hogy megvizsgáljuk a hatékonyság javításának mikrobiológiai lehetőségeit. Munkám során célul tűztem ki, hogy a biogáz termelő rendszerek mikrobiológiai hátterét megismerve egy olyan eljárást dolgozzak ki, mely a jelenleg alkalmazott technológiák mellett hatékonyabb biomassza felhasználást, és ezáltal magasabb biogáz hozamokat tesz lehetővé. A folyamatban részt vevő mikroba konzorciumban lejátszódó anyagcsere folyamatok tanulmányozása során felismertem, hogy a hidrogén a folyamat egyik fő sebesség meghatározó faktora. Megvizsgáltam annak a lehetőségét, hogy lehetséges-e a metanogén mikrobák aktivitását fokozni egy, a rendszer szempontjából megfelelően választott, tiszta kultúrában felnevelt baktérium törzs segítségével, mely az általa termelt hidrogén segítségével a biogáz fermentációt hatékonyabbá tudja tenni. Céлом volt meghatározni, hogy a hidrogén termelő sejtek alkalmazása során milyen anyagcsere változások zajlanak le a rendszerben. Meg kívántam vizsgálni, hogy a technológia megfelelően használható-e laboratóriumi léptékben, batch rendszerű és folyamatos üzemű fermentorokban, illetve kisüzemi körülmények között. Fontosnak tartottam bemutatni, hogy nagyobb léptékben is alkalmazható az eljárás, mivel a kifejlesztett új technológia a gyakorlati életben csak ekkor tudja megállni a helyét.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekhez felhasznált vegyszerek nagy része a Sigma, Reanal Vegyszergyár és a Merck cégek terméke. A baktérium törzsek a DSMZ németországi törzsgyűjteményből származnak.

4.1. Tápoldatok, táptalajok

4.1.1. *Escherichia coli* (DH5a, MC4100, DHP-F) táptalaja

Luria-Bertani, LB (Sambrook, Fritsch és Maniatis 1989) 1 literre vonatkoztatva:

- 10g pepton
- 5g élesztő kivonat
- 10g NaCl

A tápoldat összeállítását követően szükséges a pH beállítása 7,5-es értékre 1M NaOH segítségével.

A sejteket táplemezen tartottuk fenn, mely a fent felsoroltakon kívül 15g agart is tartalmazott.

4.1.2. *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* tápoldata

m640 (German Resource Centre for Biological Materials 1995), 1 literre vonatkoztatva:

- 0,90g NH_4Cl
- 0,90g NaCl
- 0,40g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,75g KH_2PO_4
- 1,50g K_2HPO_4
- 1,00g élesztő kivonat
- 1,00ml SL-10
- 1,00g cellobióz
- 0,75 g cisztein-hidroklorid
- 0,50mg rezazurin

A tápoldat összeállítását követően szükséges a pH beállítása 7.2-es értékre 1M NaOH segítségével.

4.1.3. *Enterobacter cloacae* tápoldata (DSM1)

1literre vonatkoztatva:

- 3,00g NaH₂PO₄
- 5,30g K₂HPO₄
- 1,00g NH₄Cl
- 1,00g élesztő kivonat
- 5,00g tripton
- 8,00g NaHCl
- 1,00g glükóz
- miliQ víz

A tápoldat összeállítását követően szükséges a pH beállítása 7.5-re 1M NaOH segítségével.

4.2. Mikroorganizmusok

4.2.1. *Escherichia coli* DH5α és MC4100, DHP-F

Az *E. coli* MC4100 DHP-F törzse a DH5α törzs hidrogenáz mínusz változata, mely a *hypF* gén mutációját tartalmazza (Magalon és Böck 2000). A mutáció következtében a sejtekben a hidrogenáz enzimek bioszintézise nem megy végbe, vagyis a sejtek nem képesek hidrogént termelni. A törzset Prof. Dr. August Böck és Dr. Axel Magalon (Ludwig-Maximilian Egyetem, Németország) bocsátották rendelkezésemre. Növesztése 30°C-on történt, növekedésének ütemét spektrofotométer segítségével követtem nyomon (OD₆₀₀).

4.2.2. *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (DSM8903)

Extermofil, Gram(+), obligát anaerob, pálcika alakú mikroorganizmus. Növekedési hőmérsékletének optimuma 65-75°C. Jellegzetessége, hogy extracelluláris celluláz enzimmel

rendelkezik. Izolálása elsőként új-zélandi hőforrásból történt (Rainey, és mtsai. 1994). Növesztése folyadék kultúrában történt anaerob körülmények között (DSM640 tápoldat), növekedésének ütemét spektrofotométer segítségével követtem nyomon (OD_{600}).

4.2.3. *Enterobacter cloacae* (DSM 16657)

Pálcika alakú, flagellummal rendelkező Gram(-) mezofil fakultatív anaerob mikroba. Elsősorban szennyvizekben, emlősök bélrendszerében, valamint az emberi bőrön, sőt egyes növényekben is megtalálható. Növekedésének hőmérsékleti optimuma 30°C (Hormaeche és Edwards 1960). Növesztése folyadék kultúrában történt (DSM1 tápoldat), növekedésének ütemét spektrofotométer segítségével követtük nyomon (OD_{600}).

4.2.4. Kevert természetes kultúra (oltóiszap)

A biogáz fermentációért felelős mikroba konzorcium anaerob reaktorok fermentációs maradékából származik. A fermentációt megelőzően a mikrobák aktivitásának fokozása érdekében a fermentáció tervezett hőmérsékletén inkubáltam a kevert kultúrát egy éjszakán keresztül anaerob körülmények között.

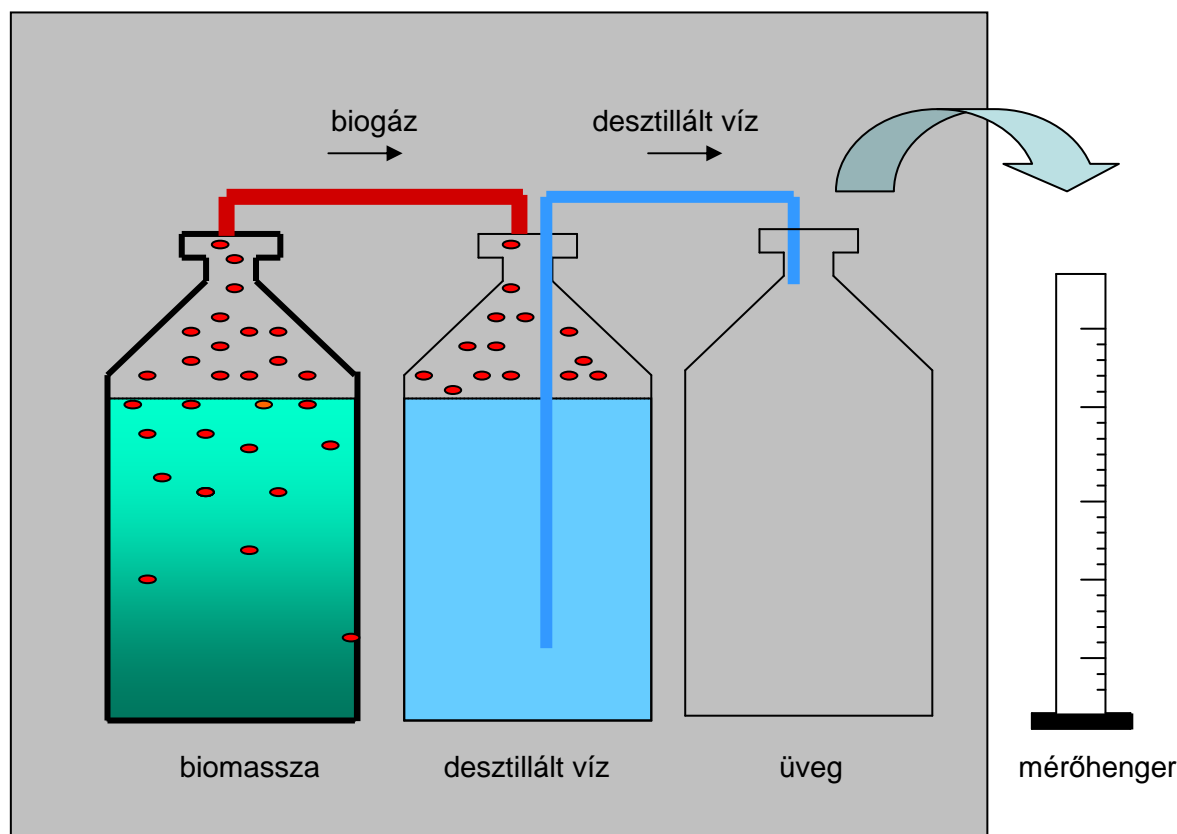
4.3. Az alkalmazott fermentációs technológia

4.3.1. Batch fermentáció

A biomassa biogázzá való alakíthatóságát légmentesen zárható, 0,5 literes térfogatú laboratóriumi fermentorokban végeztem. A fermentorokat feltöltöttem a vizsgálandó biomasszával, majd vizet adtam a rendszerhez (10%-os reaktortérre vetített szárazanyag tartalmat állítottam be), pH-ját 1M NaOH, illetve 1M HCl segítségével állítottam be 7,0-re. A fermentorok gázterét nitrogénre cseréltem ki, hogy biztosítsam az anaerob körülményeket. A fermentációt kevert természetes kultúrával (oltóiszap) indítottam el, mely a laboratóriumunkban már működő biogáz fermentorból származott. A fermentorokat 37°C-os illetve 55°C-os inkubátorba helyeztem. A reaktorok kevertetése mágneses keverővel történt. Ezen fermentáció típust „batch” fermentációnak nevezzük, mely azt jelenti, hogy a vizsgálni kívánt biomasszát a fermentorban elhelyezzük, majd a rendszert lezárjuk. A biogáz

keletkezése a fermentorban lévő biomassza elfogyását követően leáll, ellentétben az úgynevezett folyamatos üzemű fermentációval, ahol folyamatos a tápanyag utánpótlás.

A keletkezett biogáz mennyiségi meghatározása vízkiszorításos rendszerrel (13. ábra) történt. Az eljárás lényege, hogy a biomasszát, és az esetlegesen hozzáadott baktériumokat tartalmazó lezárt, anaerobbá tett üveghez egy vízzel teli második üveget kötünk, így a gáz szabadon áramolhat a második üvegbe. A beáramló gáz a saját térfogatával ekvivalens mennyiségű vizet szorít ki a harmadik üvegbe, melynek mennyiségét mérőhengerrel mértem, így naponta figyelemmel követhető a keletkezett biogáz mennyisége. Figyelembe kell vennünk, hogy a gázok térfogata különböző hőmérsékleteken eltérő. Ahhoz, hogy a keletkezett gáztérfogatok összehasonlíthatóak legyenek normál állapotra határoztam (15°C, 1 bar) meg a kapott értékeket Gay-Lussac 2. törvénye alapján minden fermentációnál.

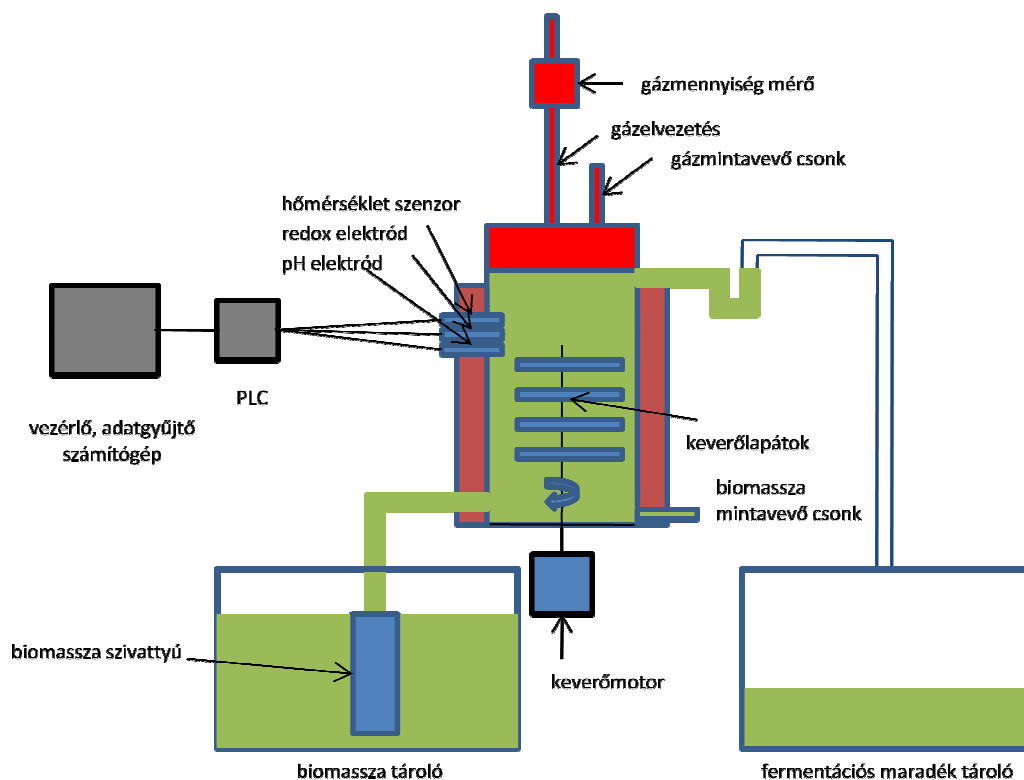


13. ábra: Batch fermentáció

A biogáz minőségi meghatározása, elemzése gázkromatográffal (Shimadzu GC2010) történt. Az alkalmazott oszlop (Carboxen 1010) lehetővé tette a hidrogén, metán, oxigén, szén-dioxid mennyiségi meghatározását adott térfogatú biogázban, mely segítségével következtetni tudtam a biogázt alkotó komponensek arányára.

4.3.2. Folyamatos üzemű fermentáció

A folyamatos üzemű fermentáció 5 literes térfogatú, speciálisan erre a célra egyedileg gyártott fermentorokkal történt (14. ábra).



14. ábra: 5 literes folyamatos üzemű fermentorok sematikus felépítése

A reaktor hasznos térfogata 5l, felette 1liter gáztér található. A fermentort irányító program szabályozni képes a hőmérsékletet, míg a redox potenciált, pH-t, elmenő gázmennyiséget rögzíti minden 4. órában (naponta 6 mintavételi pont). A szubsztrát biomassza egy tároló tartályban kerül elhelyezésre, majd kívánt tartózkodási idő függvényében a rendszer a megfelelő mennyiséget, megfelelő időközönként a rendszerbe adagolja. A keverés keverőlapátok segítségével történik. A fermentorokon kialakításra került egy gáz-, valamint egy folyadék mintavételi csonek. A fermentáció teljes időtartama alatt a pH-t, a hőmérsékletet, a tartózkodási időt (a naponta beadagolt friss biomassza mennyiségét) meghatározott értéken tartottam, a redox potenciált mértem. A biogáz fermentációban szerepet játszó mikroba törzsek számára -300mV alatti redox potenciál érték az optimális. Amennyiben ezen paraméter értéke -300mV fölé emelkedett inert nitrogén gázzal mostam át a fermentorok légtérét a megfelelő anaerobicitás kialakítása érdekében. A hőmérsékletet elektromos fűtőköpeny segítségével az automatika a kívánt hőmérsékleten, +/- 0,2°C-on

tartotta. A pH-t 6,5-7,5 közötti tartományra állítottam be, amennyiben szükséges volt NaOH-t, illetve HCl-t adagoltam a reaktorokba.

4.4. Szárazanyag tartalom meghatározás

A szubsztrátként felhasznált biomassza szárazanyag tartalmának meghatározásához 80°C-os szárítószekrényben a mintákat egy éjszakán keresztül szárítottam, majd a visszamaradt tömeg alapján következtettem azok szárazanyag tartalmára.

4.5. Szervesanyag tartalom meghatározás

A szárazanyag tartalom meghatározás során keletkezett mintákat 550°C-on hevítettem tömegállandóságig, a visszamaradt tömegből következtettem azok szervesanyag tartalmára.

4.6. Összes széntartalom, szerves széntartalom, összes nitrogén tartalom meghatározás

A minták vizsgálatát Teledyne Tekmar Apollo 9000 automata TOC analizátorral végeztem. A műszer a vizsgálandó biomasszát 730°C-ra hevített égetőcsőben elégeti, majd a keletkezett CO_x és NO_x gázok mennyiségéből (IR detektor) előzetes kalibrációt követően következtet a minták szén és nitrogén tartalmára.

4.7. Szubsztrát biomasszák

A kísérletek során alkalmazott szubsztrát biomasszák a következők voltak:

biomassza	szárazanyag tartalom (%)	szervesanyag tartalom (%/SZÁA)	C/N arány
bagasse	94,30	93,70	61,5
silókukorica	31,23	94,41	51,4
cukor cirok	29,85	94,92	48,8
konyhai hulladék	18,24	90,63	28,4
szarvasmarha hígtrágya	5,81	75,49	20,3

sertés hígtrágya	4,44	71,80	14,9
gyógyszeripari hulladék	21,28	77,14	6,8
szeszgyártási melléktermék	6,96	88,40	6,5
szennyvíz iszap	3,02	74,00	6,2
húspép	23,41	96,84	2,9

4.8. DNS izolálás

A *C. saccharolyticus* genomi DNS izolálását QIAmp DNA Stool Mini Kit segítségével végeztem el (Qiagen, Hilden, Németország) a gyártó leírása szerint, azzal a különbséggel, hogy a DNS-t az oszlopról 50µl eluáló oldattal mostam le.

4.9. Polimeráz láncreakció (PCR)

4.9.1. A *C. saccharolyticus* azonosítása sertés hígtrágyából PCR reakció segítségével

Polimeráz láncreakció segítségével mutattam ki a *C. saccharolyticus* DNS-ét a biogáz fermentorból vett mintákban. Csechao-1 (5'-GGCGGAAGTAGCATAGACAC-3') és csechao-2 (5'-TGCGATGGTAGCACCAACAC-3') primer pár segítségével az *echA* membrán kötött Ni-Fe hidrogenáz alegység 450 bp-os szakaszát sokszoroztam fel, míg a cscelao-1 (5'-TGGAGCATGGTCATGGAAGA-3') és cscelao-2 (5'-CCAATCAAGCGTCGATGGTA-3') primer pár segítségével a *celA* celluláz alegység génjének 475 bp hosszú szakaszát. A PCR elegy 5X Phusion HF puffert, 1.5M MgCl₂, 2mM deoxiribonukleotid-trifoszfát keveréket, 10µM oligonukleotid primert, 0,3 egység PhusionTM High-Fidelity DNS polimerázt (Finnzymes, Espoo, Finnország), és 3µl tisztított DNS-t tartalmazott 30µl-es térfogatban. A negatív kontroll PCR nem tartalmazott templát DNS-t, míg a pozitív kontrollhoz tisztított *C. saccharolyticus* genomi DNS-t adtam. A PCR reakciót Mastercycler (Eppendorf, Németország) típusú PCR berendezésben végeztem el, a következő feltételeket alkalmazva:

30s denaturálás 98°C-on, 50 ciklus (10s denaturálás 98°C-on, 30s annealing 70°C-on a *celA* fragment esetében, míg 71°C az *echA* fragment esetében, végül 30s elongáció 72°C-on), majd 30s elongáció 72°C-on.

A keletkezett PCR terméket gélelektroforézis segítségével mutattam ki 1%-os agaróz gélen. Fermentas GeneRuler 1-kb DNS markert használtam a keletkezett PCR termék méretének meghatározásához.

4.9.2. A *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* sejtek DNS-ének mennyiségi meghatározása szennyvíziszapból Real Time PCR segítségével

A DNS tisztítására a QIAmp DN Stool Mini Kitet használtam (Qiagen, Hilden, Németország), betartva a gyártó által megadott protokollt. Egyetlen eltérés az volt, hogy a végső elúciós térfogat a megadott 200µl helyett 50µl volt.

A polimeráz láncreakcióhoz két primerpárt alkalmaztam, hogy a mennyiségi meghatározást elvégezhessem. Az első pár, CelFP1 (5' GGGTCCTGCTGAGGTTATGC 3') és CelRP1 (5' GCTAAGGAAGCTGCCGTCTCT 3'), a mikroba *CelA* génjéből sokszoroz fel egy 99 bp-os szakaszt, ami egy celluláz alegységet kódol. A másik primerpár EchFP1 (5' TCAGCACAGTTTCCGTTCCA 3') és EchRP1 (5' TCCTGCTTTTACCATTGTACTTGAA 3') egy 99 bázispáros fragmentumot amplifikál fel az *echA* génből, ami egy membránköti Ni-Fe hidrogenáz alegységet kódol.

A PCR elegy tartalmazott 2X-es Power SYBR green PCR mastermixet (Applied Biosystems), oligonukleotid primert 1µM koncentrációban primerenként, valamint 1µl tisztított DNSt, 25µl végtérfogatban. Negatív kontrollok nem tartalmaztak templát DNSt, illetve olyan fermentor mintákból tisztított genomi DNSt tartalmaztak, amelyeket előzetesen nem oltottam le *C. saccharolyticussal*. Pozitív kontroll reakciók olyan genomi DNSt tartalmaztak, amelyeket tiszta *C. saccharolyticus* kultúrából tisztítottam. A standard reakciók is tisztított genomi DNSt tartalmaztak. A DNS koncentrációkat Nanodrop spektrofotométerrel (ND-1000 UV/Vis) mértem. A PCR reakciókat Real Time PCR berendezéssel készítettem el (Applied Biosystems RTP 7500, United Kingdom), amely során a következő körülményeket alkalmaztam: 50°C 2 perc; 95°C denaturáció 10 perc; 40 ciklus 95°C-os denaturációval 15s-ig, valamint 60°C-os annealinggel 1 percig (az adatgyűjtés ennél a lépésnél történt). Ezt követte egy disszociációs lépés: 95°C 15s, 60°C 1 min, 95°C 15s. Az eredményeket a gyártó által biztosított szoftverrel (7500 system sequence detection software v 1.4) analizáltam.

4.10. Ecetsav mennyiségi meghatározása

Az ecetsav mennyiségét nagynyomású folyadékkromatográfia (Hitachi Elite LaChrom HPLC) segítségével határoztam meg. Az eredmények leolvasása és kiértékelése EZChrome Elite programmal történt. Oldószerként 0,01M kénsavoldatot használtam, melynek áramlási sebessége 0,8ml/perc volt. A minták elválasztása ICsep ICE-COREGAL 64H oszloppal történt, azonosításuk L-2490 refraktív index detektorral. Mérés előtt a mintákat először szűrőpapíron, majd 0,2µm pórusátmérővel rendelkező fecskendőszűrőn leszűrtem, annak elkerülése érdekében, hogy a szennyeződések, bakteriális sejteket felvigyük az oszlopra.

4.11. Biogáz minőségi összetételének vizsgálata

A keletkezett biogáz összetételének meghatározását gázkromatográf segítségével végeztem el (Shimadzu GC-2010, Carboxen 1010 kolonna). A fermentorokon kialakítottunk egy gázminta vételre alkalmas szeptumot, melyen keresztül vettem a gázmintákat. Hővezető képesség detektort, valamint nitrogén vivőgázt alkalmaztam.

4.12. pH meghatározás

A minták pH értékét pH elektród (Radelkis OP-211) segítségével határoztam meg.

4.13. Sűrűség meghatározás

A minták sűrűségét automata sűrűségmérővel határoztam meg (Grabner Instruments, Minidens).

4.14. Ammónium-ion tartalom meghatározás

A minták ammónium-ion tartalmának meghatározását Spectroquant Nova60 (Merck) reagensteszt (1.00683.0001) segítségével történt. Mérés előtt a mintákat először szűrőpapíron, majd 0,2 µm pórusátmérővel rendelkező fecskendőszűrőn leszűrtem, mivel a használt műszer spektrofotometriás elven működik, így a minta zavarossága hamis pozitív eredményt adhat.

5. Eredmények

Habár a biogáz fermentációjáért felelős mikroba konzorcium metabolikus folyamatainak pontos részletei nem ismertek, a jelenlegi tudásunk azt sugallja, hogy a hidrogén lehet a limitáló szubsztrát a metanogének számára. A felismerés abból a tényből következik, hogy míg az acetogén baktériumok igen jó hidrogén termelők a végső termékben, vagyis a biogázban a hidrogén csak nyomokban mutatható ki. A keletkező hidrogént valószínűsíthetően a metanogén mikrobák használják fel. A lehetséges megfelelő kísérleti módszer annak igazolására, hogy a hidrogén valóban fontos szerepet játszik a metanogének aktivitásában a biogáz fermentációért felelős mikroba konzorcium leoltása egy olyan tiszta kultúrájú baktérium törzsszel, mely jó hidrogén termelő aktivitással rendelkezik. Abban az esetben, ha *in situ* hidrogén bevitellel a metanogén törzsek aktivitása fokozható különböző fermentációs hőmérsékleten és különböző szubsztrát biomasszákon bizonyítható, hogy a hidrogén a rendszer egyik kulcsfontosságú limitáló faktora, mivel különböző környezeti feltételek mellett a természetes mikroba konzorcium összetétele eltérő.

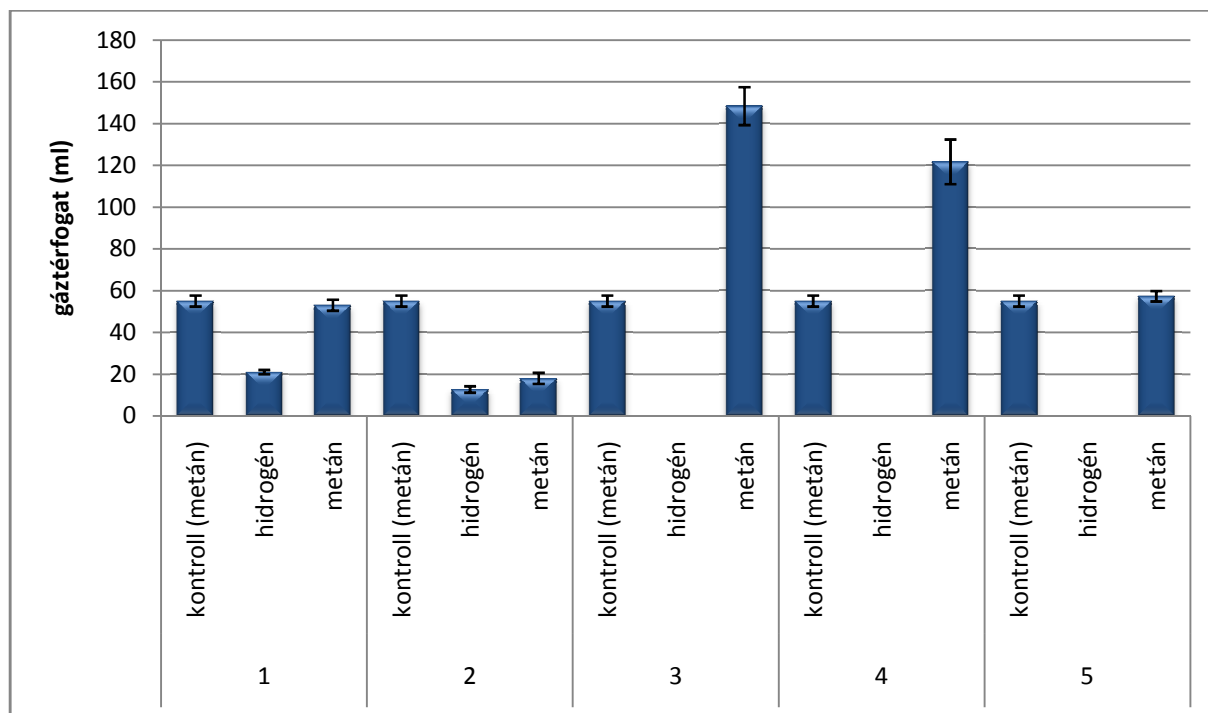
A számos lehetséges hidrogén termelő törzs közül mezofil hőmérsékleten az *Enterobacter cloacae*-re esett a választásom (Kovács, Bagyinka és Verebély 1985), míg termofil hőmérsékleten a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*-ra (Bagi, és mtsai. 2004). Az *Enterobacteriaceae* család kiváló hidrogén termelő aktivitással rendelkezik (Das és Veziroglu 2001, Hallenbeck és Benemann 2002), míg a *C. saccharolyticus*-ra ugyan ez mondható el termofil hőmérsékleten (van Niel, és mtsai. 2002, van Niel, Claassen és Stams 2003), melyhez cellulolitikus aktivitás társul (Rainey, és mtsai. 1994, Ivanova, Rákhely és Kovács 2008).

5.1. A biogáz fermentáció mikrobiológiai intenzifikálási lehetősége

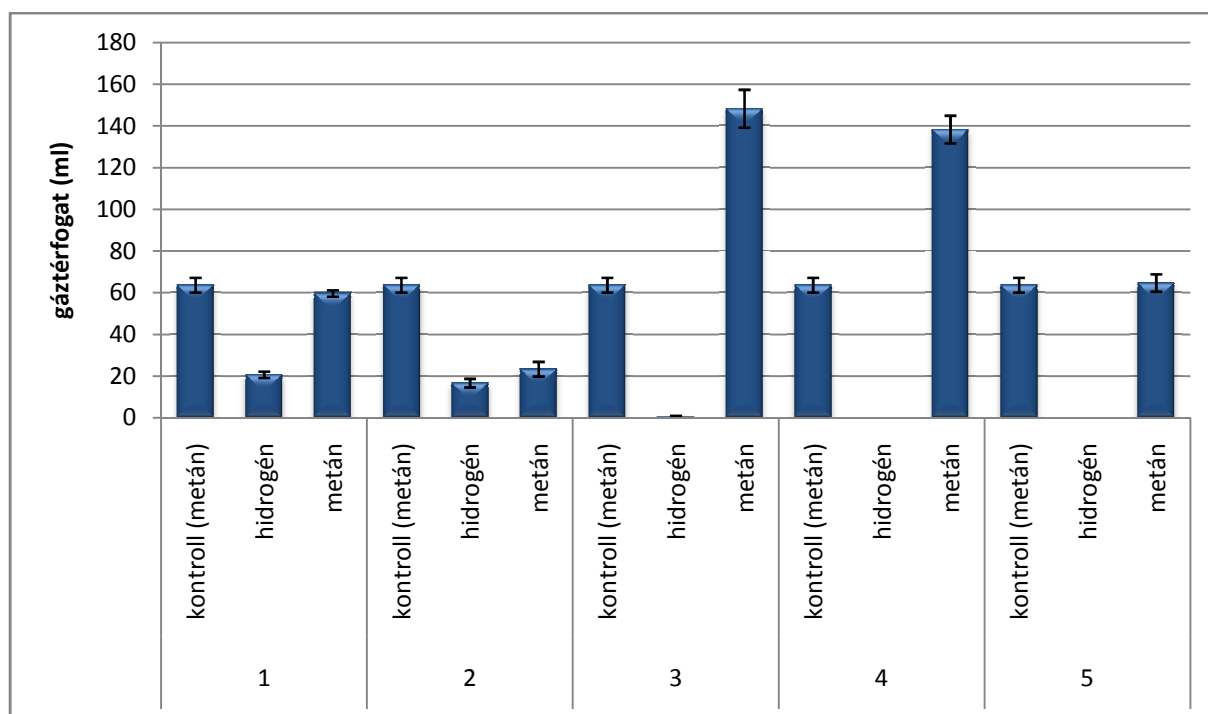
5.1.1. A hidrogén pozitív hatásának vizsgálata a biogáz fermentáció során detektált gázhozamokra

Annak eldöntésére, hogy valóban a hidrogén játsza a fő szerepet a metanogének aktivitásának szabályozásában több kísérletet végeztem, melyekben különböző úton közelítettem meg a feladatot. A méréseket mind *E. cloacae*-vel (15. ábra), mind *C. saccharolyticus*-al (16. ábra) elvégeztem.

- (1) hidrogént adagoltam gáz halmazállapotban a kevert metanogén kultúrát tartalmazó anaerob üvegekbe (5ml, minden 2. nap)
- (2) külön, anaerob körülmények között felnövesztettem a hidrogén termelő törzset tiszta kultúrában, majd az üveg gázterét összekötöttem a kevert metanogén kultúrát tartalmazó üveggel
- (3) hidrogén termelő törzzsel oltottam le a kevert metanogén kultúrát (5v/v%)
- (4) a hidrogén termelő sejteket centrifugálással elkülönítettem a tápoldattól, melyben növesztettem azokat, a sejteket elegyítettem a kevert metanogén kultúrával
- (5) hővel inaktiváltam (120 °C, 30 perc) a hidrogén termelő sejteket, majd azokkal beoltottam a kevert metanogén kultúrát



15. ábra: Sejtek közötti hidrogén átadás fontossága a biogáz fermentációban (*Enterobacter cloacae*)

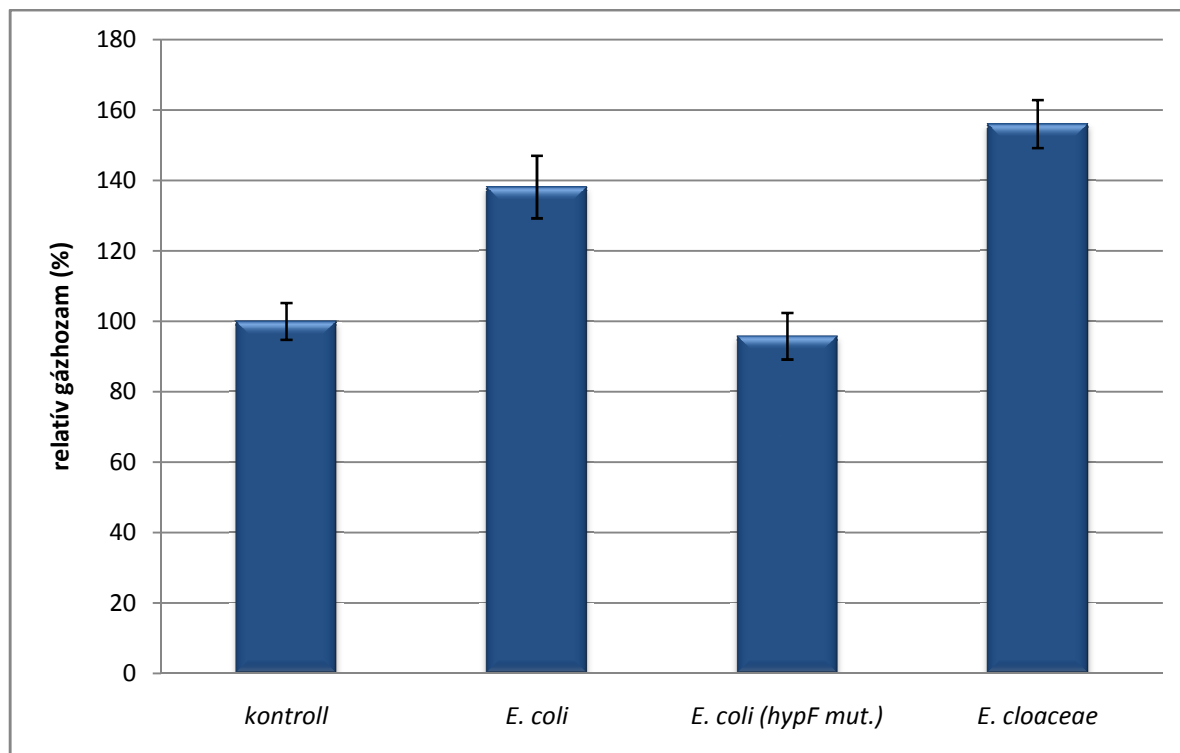


16. ábra: A sejtek közötti hidrogén átadás fontossága a biogáz fermentációban (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*)

A batch fermentációk eredményei megmutatják, hogy csakis abban az esetben volt tapasztalható megnövekedett metán hozam, mikor a rendszerbe élő hidrogén termelő sejteket vittem be. A hatás nem annak volt köszönhető, hogy a sejtekkel együtt bevitt, a baktériumok növesztése során felhasznált tápoldat maradékot felhasználták a metanogén mikrobák. Szintén nem játszottak szerepet az elpusztult sejtekből felszabaduló egyéb anyagcseretermékek. A gáz formájában bejuttatott H_2 nem volt pozitív hatással a metanogének aktivitására, akár tiszta hidrogénről (gázpalackból), akár az *E. cloacae*, vagy a *C. saccharolyticus* által termelt hidrogénről legyen szó.

5.1.2. HypF⁻ *E. coli* mutáns alkalmazása a biogáz fermentorban

Mivel az *Enterobacteriaceae* család egyéb tagjai is jelen vannak a biogáz fermentációért felelős mikroba konzorciumban, valamint a szubsztrátban, ezért a megnövekedett gázhozamok és a hidrogén termelő törzs közötti kapcsolatot *E. coli* hypF⁻ mutánsával is megvizsgáltam (17. ábra).

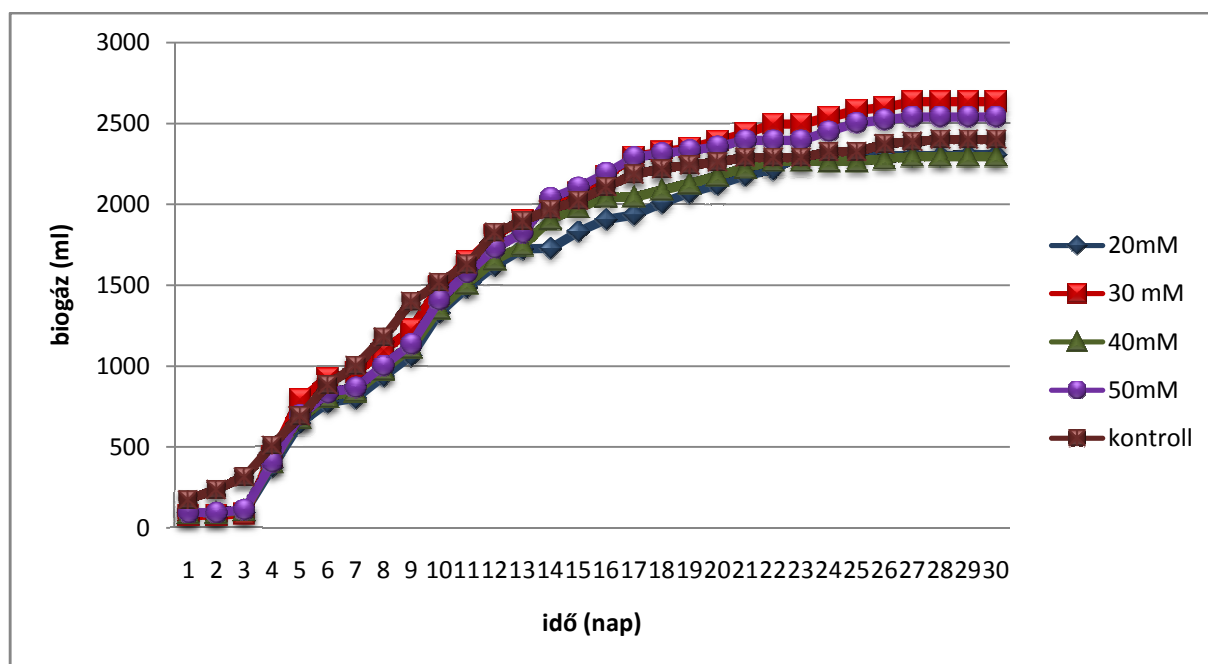


17. ábra: A hidrogén szerepe a megnövekedett gázhozamokban

A *hypF* gén egy pleiotropikus hatású kisegítő fehérjét kódol, mely elengedhetetlenül szükséges az összes NiFe hidrogenáz gén éréséhez *E. coli*-ban, a mutáns törzs nem képes hidrogént termelni. *HypF* mínusz mutáns *E. coli* adagolása az anaerob fermentorhoz a kontroll fermentorban tapasztalható biogáz termelést eredményezett (17. ábra). Párhuzamos kísérletekben a vad típusú *E. coli* megnövekedett gázhozamokat produkált, csakúgy, mint a közeli rokon *E. cloacae*.

5.1.3. Az ecetsav hatása a biogáz fermentációra

A hidrogén mellett a hidrogén termelő törzs biogáz fermentorban történő alkalmazása során egyéb vegyületek is felszabadulhatnak a bevitt mikrobák anyagcseréje során. Elvileg ezek a fermentációs termékek is okozhatják a metanogén törzsek aktivitásának növekedését. A CO₂ nagy valószínűséggel nem játszik ebben szerepet, mivel állandó CO₂ felesleg található a reaktortérben. Az ecetsav jöhet esetünkben még számításba, ezért az ecetsav hatásának kiderítése céljából különböző koncentrációban adagoltam nátrium-acetátot a biogáz fermentorba (18. ábra).

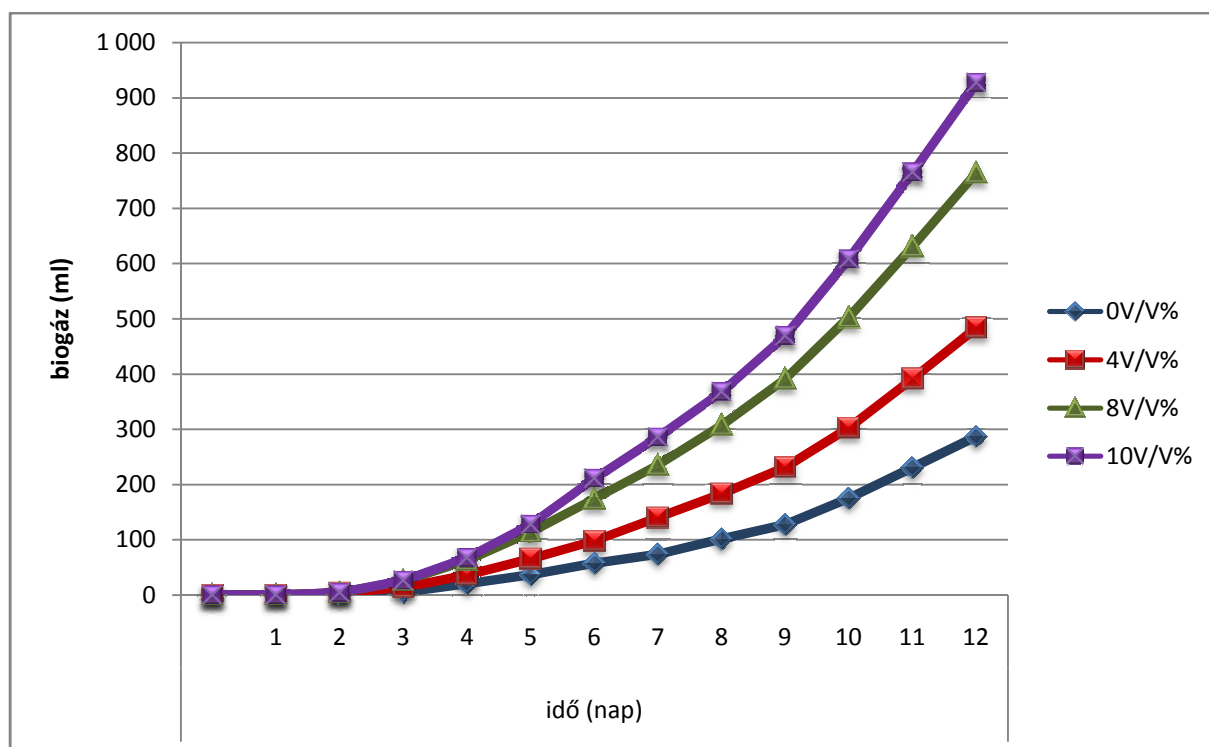


18. ábra: Na-acetát adagolása a biogáz fermentorokhoz

A különböző koncentrációkban bevitt ecetsav nem volt szignifikáns hatással a biogáz hozamokra, nem volt összefüggés tapasztalható a bevitt ecetsav mennyisége, és a keletkezett biogáz mennyisége között. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az ecetsav nem játszik szerepet a metanogén törzsek aktivitásának fokozásában.

5.1.4. A hidrogén termelő törzs leoltási arányának hatása a fermentációra

A hidrogén termelő törzs biogáz fermentációt fokozó hatása nagymértékben függhet a rendszerbe bevitt baktériumok mennyiségétől. Különböző leoltási arányokat alkalmaztam annak meghatározása érdekében, hogy a leoltott hidrogén termelő baktérium törzsek mennyiségétől hogyan függ az intenzifikáció mértéke (19. ábra).



19. ábra: Biogáz képződés különböző koncentrációban leoltott hidrogén termelő törzs esetén

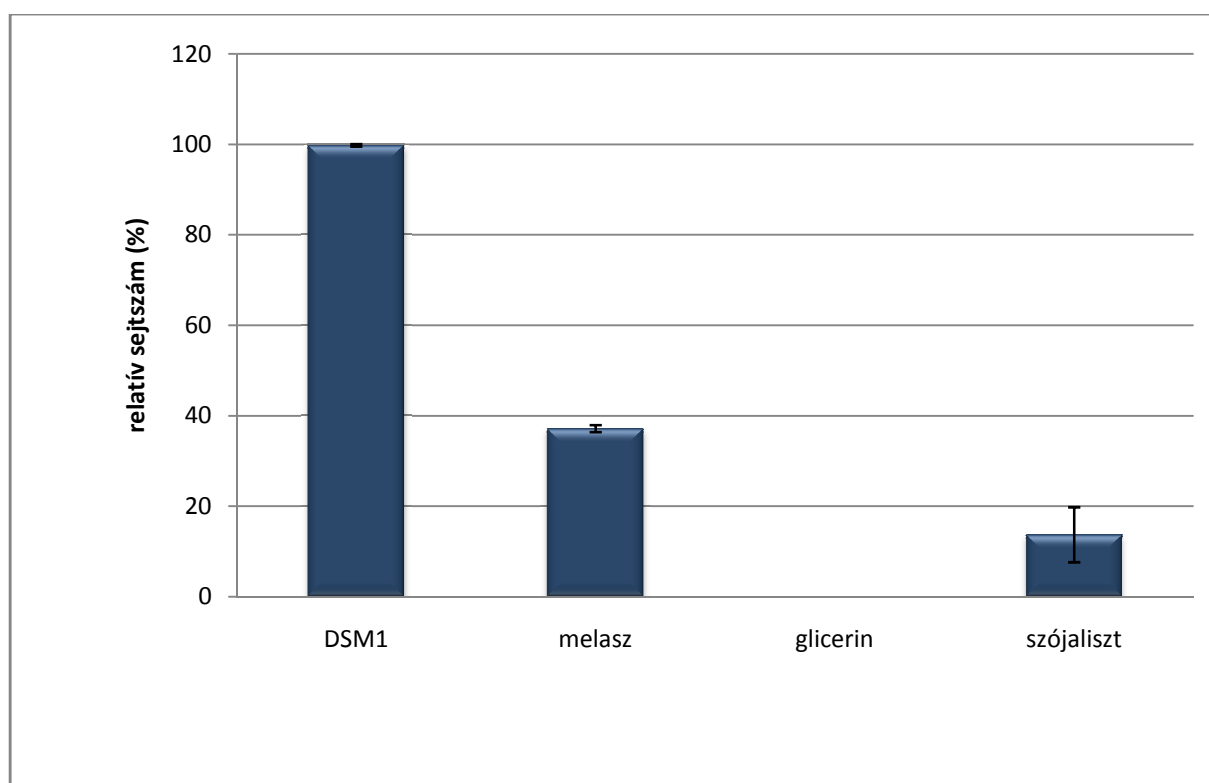
A növekvő koncentrációban bevitt hidrogén termelő törzs és a biogáz hozam megnövekedése között összefüggés áll fenn. Minél több hidrogén termelő sejtet vittem be a fermentorba a keletkező biogáz mennyisége annál magasabb volt. Ez azt bizonyítja, hogy a metanogének aktivitásának növekedése függ a hidrogén termelő sejtek mennyiségétől, vagyis a fermentorban keletkező H_2 -től.

Mivel a hidrogén termelő törzseket tiszta kultúrában neveltem fel azok mennyiségi adagolása megfelelően kontrolálható volt. Ipari léptékben történő alkalmazás során a leoltás mennyiségének pontos meghatározása finanszírozási okok miatt elengedhetetlen. Már 4v/v%-os leoltási arány esetében is tapasztalható szignifikáns biogáz hozam növekedés, mely a bevitt sejtek mennyiségének növekedésével fokozódik. Az ipari léptékben szükséges és gazdaságosan alkalmazható arány nagyban függ az adott ipari létesítmény felépítésétől (térfogat, szubsztrát, tartózkodási idő stb.), ezért azt egyedileg kell meghatározni minden esetben. Költségcsökkentési megoldásként jöhet szóba a tiszta kultúrájú hidrogén termelő törzsek olcsó, ipari melléktermékeken történő tenyésztése.

5.1.5. Ipari tápoldatok a hidrogén termelő törzsek számára

5.1.5.1. *Enterobacter cloacae*

Az *E. cloacae* igen jól tenyésztethető egyszerű összetételű tápoldatokon, ezért a választásom a melaszra, a szójalisztra és a glicerinre esett. A különböző tápoldatokon felnövő sejtek számának meghatározását spektrofotometriás méréssel végeztem el. Ez alapján a melasz bizonyult a legmegfelelőbb tápoldatnak, a speciálisan e törzs számára ajánlott tápoldathoz képest ezen nőtt fel a legnagyobb mértékben (20. ábra), a sejtszám 37%-a a DSM1 tápoldaton felnőtt kultúrának. Ez az érték ugyan jóval alacsonyabb, mint az optimális tápanyag összetételű oldaton növesztett sejtszám, de ipari léptékben megfelelőnek tekinthető.



20. ábra: *Enterobacter cloacae* növesztése különböző tápoldatokon

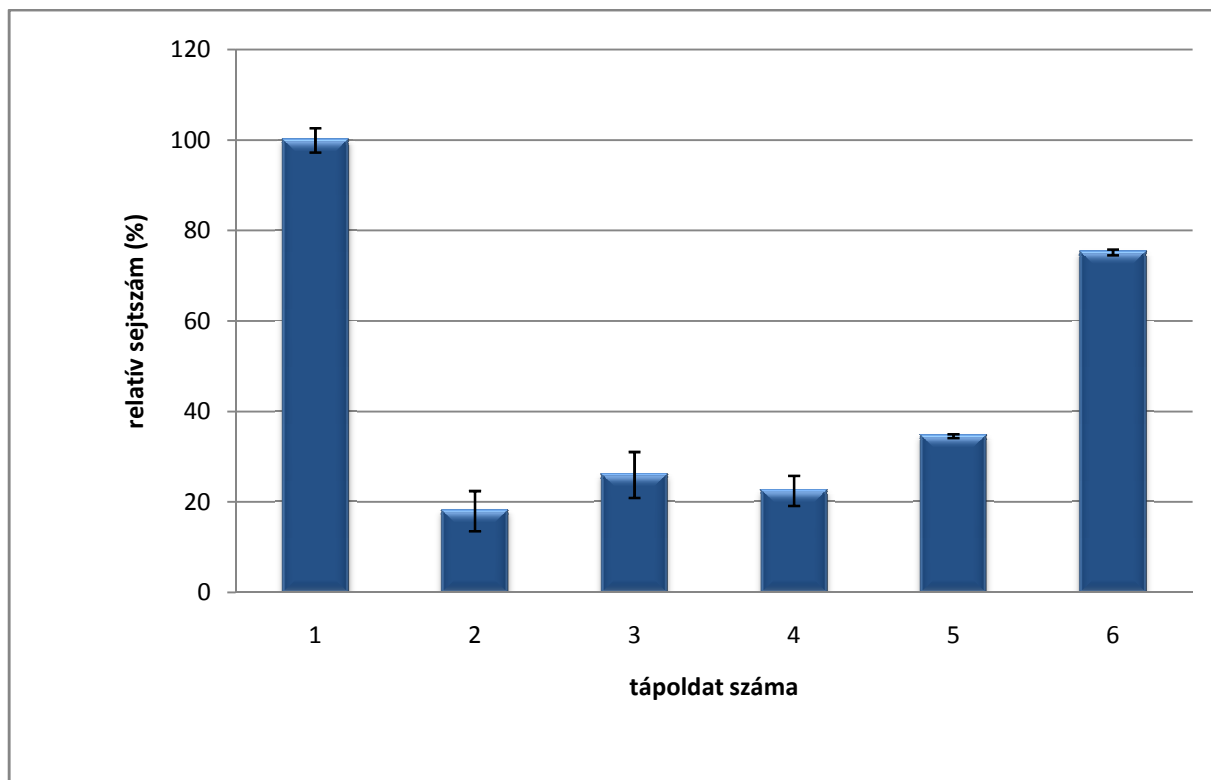
5.1.5.2. *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*

A *C. saccharolyticus* tápoldatában sókat, szén-, nitrogénforrást, nyomelemeket, redukálószer és indikátor vegyületet találunk (German Resource Centre for Biological Materials 1995). Különböző tápoldatokat mértem össze, melyekben az irodalomban

meghatározott komponensek egy részét kihagytam, valamint a szén és nitrogénforrásként alkalmazott élesztő kivonatot ipari melléktermékekre cseréltem (glicerín, melasz, szójaliszt) (21. ábra). Az eredmények (22. ábra) alapján elmondható, hogy a 6. számú tápoldat bizonyult a legmegfelelőbbnek, a sejtszám mindössze 25%-al volt alacsonyabb, mint a DSM640 tápoldat esetében.

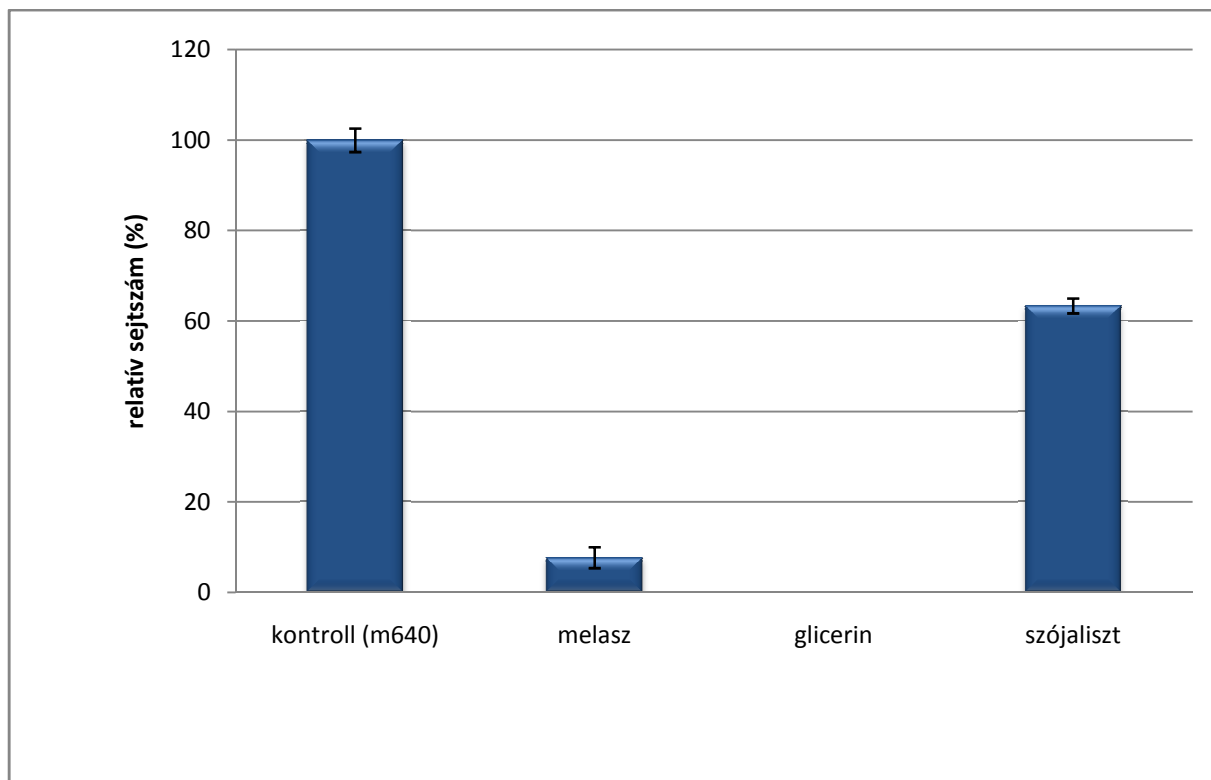
	1	2	3	4	5	6
tápoldat komponens	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	x
	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	x
	MgCl ₂ x6H ₂ O	x	x	x	x	x
	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	x
	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄	x
	élesztő kivonat	élesztő kivonat	élesztő kivonat	melasz	élesztő kivonat	glicerín
	SL-10	SL-10	x	x	melasz	melasz
	FeCl ₃ x6H ₂	x	x	x	x	sojaliszt
	cellobióz	x	x	x	x	x
	cisztein-HCl	cisztein-HCl	x	x	x	x
	rezaurin	x	x	x	x	x

21. ábra: A *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* növesztésére használt tápoldatok



22. ábra: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* növesztése különböző tápoldatokon

Ezt követően lényegesnek tartottam meghatározni, hogy monokomponensű tápoldaton képes-e növekedni a *C. saccharolyticus*. Az *E. cloacae*-nél alkalmazott szójalisztre, glicerinre és melaszra esett a választásom. Az eredmények (23. ábra) alapján elmondható, hogy a *C. saccharolyticus* szójaliszten, mint monokomponensű tápoldaton tenyészthető.

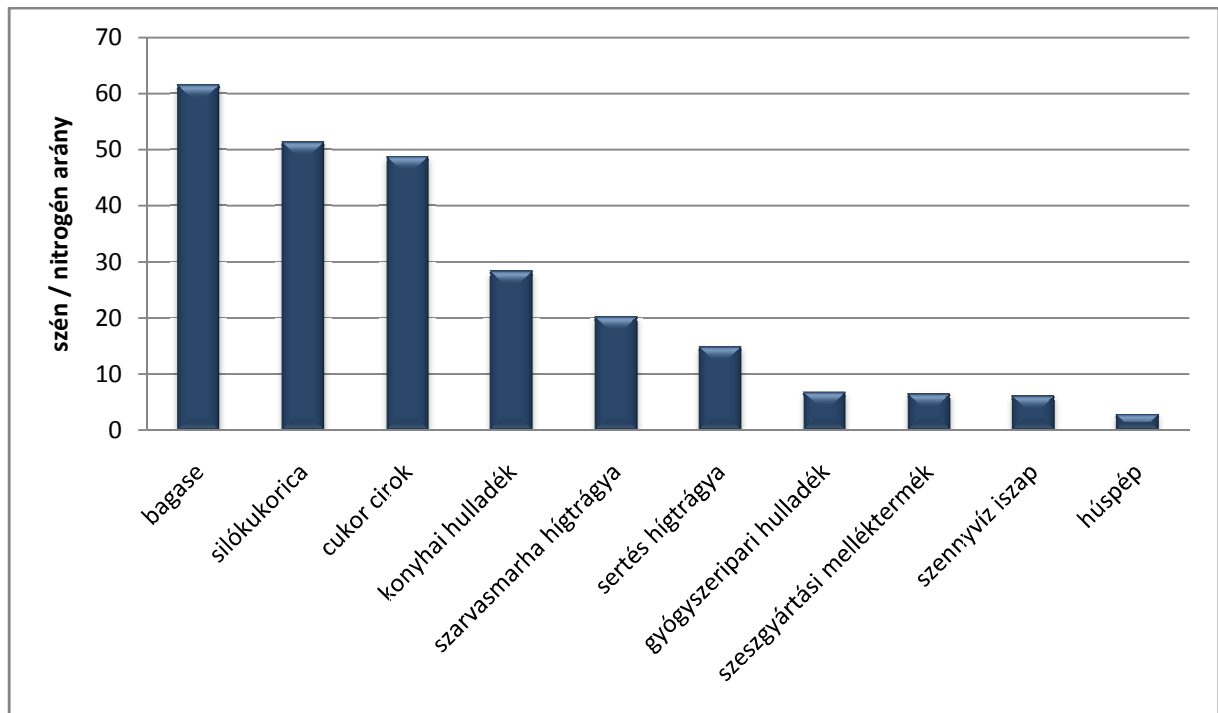


23. ábra: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* tenyésztése monokomponensű tápoldatokon

5.2. Batch üzemű biogáz fermentációs mérések

5.2.1. Szubsztrát biomassa

A fermentációk során különböző típusú szubsztrátokat alkalmaztam. A kísérlet előtt meghatároztam a fermentorban lévő anyag szén/nitrogén arányát (24. ábra), szárazanyag tartalmát, valamint szervesanyag tartalmát.



24. ábra: A kísérletek során alkalmazott szubsztrát biomasszák C/N aránya

5.2.1.1. bagasse

A bagasse a cukorgyártás mellékterméke, a cukornád feldolgozását követően megmaradó cellulózban gazdag növényi rostok összefoglaló neve. A magas cellulóztartalmának köszönhetően igen magas a széntartalma, a cellulóz a sejtek számára nehezen hasznosítható alapanyag. Magas a C/N aránya, mely a biogáz fermentáció szempontjából nem ideális.

5.2.1.2. silókukorica

Nagy mennyiségben használják állati takarmányozásra, elsősorban silózott formában. Magas hozama és energiatartalma következtében biomassza erőműben is alkalmazható, ahol égetés segítségével hasznosítható. Jelentős fehérje, foszfor és kálium tartalommal rendelkezik. Biogáz fermentációban zöld növényi formában kerül feldolgozásra.

5.2.1.3. cukor cirok

Szilázsként szarvasmarhák és juhok téli tömegtakarmánya. Biogázt és bioetanolt is lehet belőle gazdaságosan előállítani. A zöld növényi szár és levél alkalmas feldolgozásra, mely 14-17% cukortartalommal, valamint jelentős fehérje és vitamin tartalommal rendelkezik.

5.2.1.4. sertés hígtrágya

A sertés hígtrágya nagyrészt vízből áll, szárazanyag tartalma 2-6% között változik. Jelentős mennyiségű nitrogént (0,8-8,0g/l), valamint foszfátot (0,3-2,0g/l) tartalmaz. Ezek mellett nagyobb mennyiségben található benne nátrium (14-31mg/l), magnézium (22-75mg/l) és kén (14-85mg/l) (Barótfi 2000).

5.2.1.5. szarvasmarha hígtrágya

A szarvasmarha hígtrágya a sertéshez hasonló összetételű. Jelentős eltérés a benne található mikroba törzsek összetételében van, itt a szarvasmarha emésztőrendszerének felépítéséből adódóan nagy mennyiségben megtalálhatók a biogáz fermentációban részt vevő mikroorganizmusok keveréke.

5.2.1.6. konyhai hulladék

Mesterségesen összeállított konyhai hulladék biomasszáat alkalmaztam méréseim során, mely tartalmazott ételmaradékot, kenyeret, zöldséget és egyéb növényi melléktermékeket.

5.2.1.7. gyógyszeripari hulladék

A biomassa a TEVA debreceni gyógyszergyárából származott. A technológiai folyamataik melléktermékeként veszélyes hulladéknak minősülő, nagy szervesanyag tartalommal rendelkező biomassa keletkezik, melynek két fő komponense a gomba micéliumok, valamint a vegyszeres és biológiai szennyvíziszap. A biomassa fő tömegét a mikofenolsav és a lovastatin fermentációjáért felelős gomba micéliumok alkotják.

5.2.1.8. szeszgyártási melléktermék

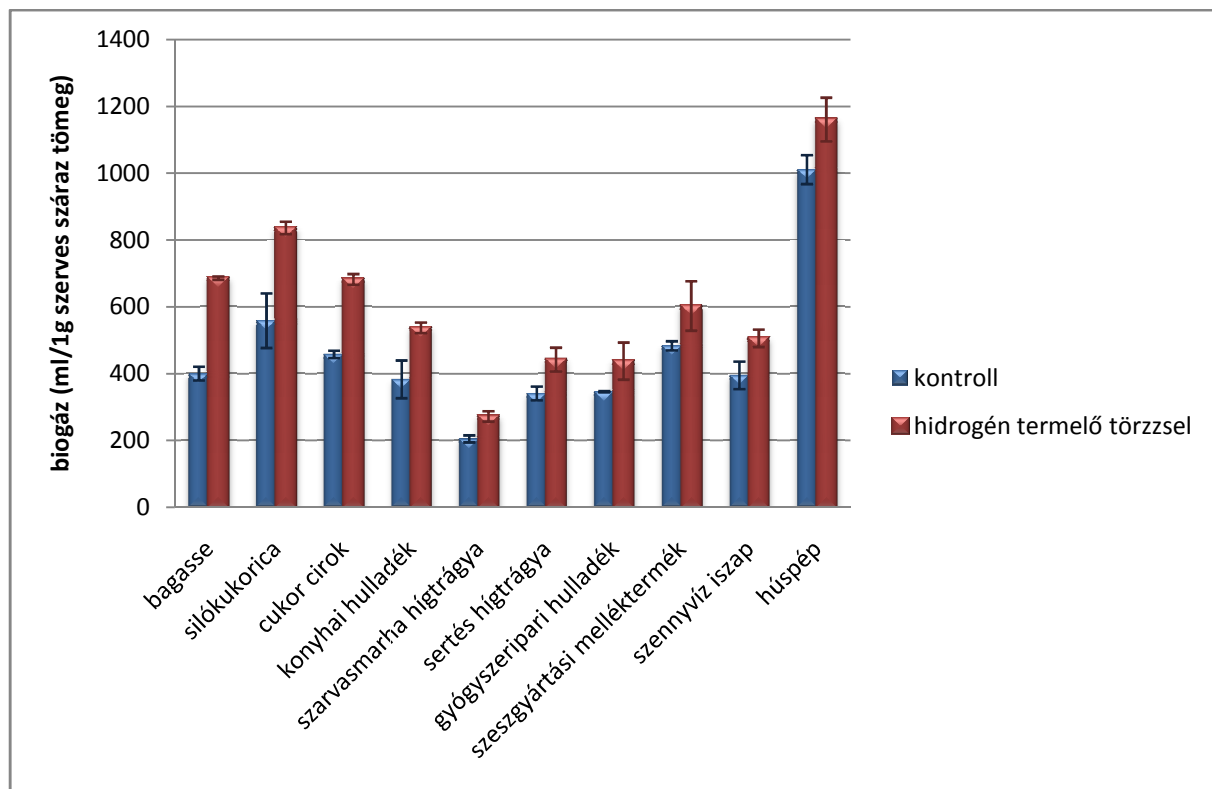
A bioetanol gyártás melléktermékeként keletkező magas fehérjetartalmú, sűrű folyadék a „szeszmoslék”. Biogáz fermentáció mellett állati takarmányként hasznosítható.

5.2.1.9. húspép

Baromfiipari melléktermék, mely főként az emberi fogyasztásra alkalmatlan részekből áll. A húspépet a vágóhidakon sterilizálják, majd rendszerint savak hozzáadásával stabilizálják. Általában a sertéstakarmányozásban kerül felhasználásra azokban az üzemekben, ahol nedves etetési technológiát alkalmaznak. Mivel jóformán csak fehérje alkotja igen magas a nitrogén tartalma.

5.2.2. Batch üzemű fermentációk mezofil hőmérsékleten

A batch üzemű fermentációkat minden esetben 0,5 literes térfogatú laboratóriumi fermentorokban végeztem, az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. A keletkezett biogáz mennyiségét naponta olvastam le, 30 nap elteltével a keletkezett gázmennyiségeket összesítettem. A teljes biogáz hozamokat minden esetben 1g szerves száraz tömegre normáltam (1, 2, 3, 4. mellékletek).



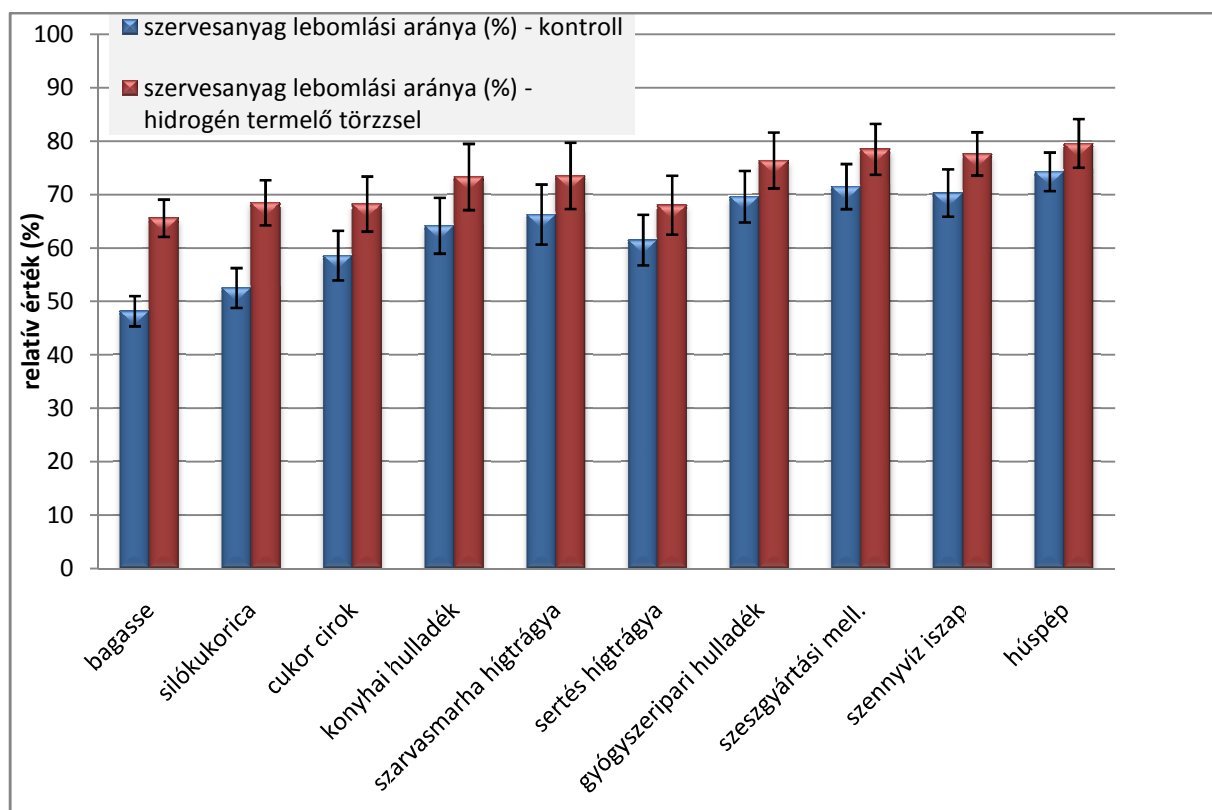
25. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok mezofil hőmérsékleten

A fermentációkat tíz különböző szubsztráttal végeztem el. A legnagyobb gázhozamot a húspép alkalmazása során detektáltam, míg a legalacsonyabb a szarvasmarha hígtrágya felhasználásakor adódott. A húspép igen jól hasznosítható szubsztrát a mikroorganizmusok számára, magas fehérjetartalmánál fogva jelentős energiatartalommal rendelkezik. A szarvasmarha hígtrágya a szarvasmarha emésztő rendszerének felépítéséből adódóan jóval kisebb tápanyag tartalommal rendelkezik, a biogáz fermentációban részt vevő mikroorganizmusok ebből kevesebb energiához jutnak. Az egyéb alkalmazott biomasszák gázkihozatali értékei a fent említett két szélső érték közé esnek, a belőlük nyert biogáz mennyisége összhangban van azzal, hogy a baktériumok milyen hatékonysággal képesek azt anyagcsere folyamataik révén átalakítani (25. ábra).

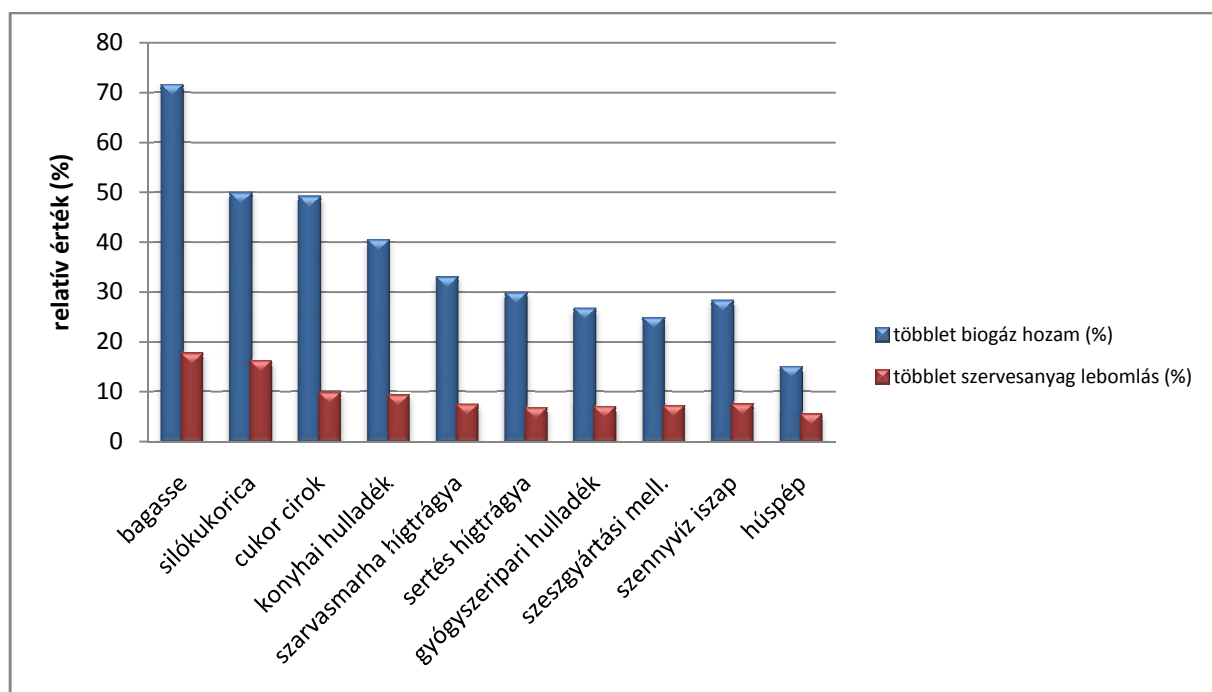
A hidrogén termelő törzzsel leoltott fermentorok az összes szubsztrát esetében magasabb gázhozamokat produkáltak. A gázhozam többletek esetében összefüggés figyelhető meg az intenzifikáció mértéke, valamint a szubsztrát szén/nitrogén aránya között (27. ábra). Az ábrán látható többlet biogáz hozamok, illetve többlet szervesanyag lebomlási arányok a megfelelő kontroll fermentációk eredményeihez viszonyított, százalékban megadott értékek. A nagyobb C/N aránnyal rendelkező biomassza fermentációja során nagyobb mértékű intenzifikáció volt tapasztalható. A szubsztrát biomassza szükséges a hidrogén termelő

törzsek szaporodásához is, melyből fedezik szén, illetve nitrogén szükségletüket. A fermentatív tevékenységük során nemcsak hidrogén termelésük révén járulnak hozzá a megnövekedett biogáz hozamokhoz, hanem a biokémiai folyamataik alkalmával termelt ecetsav mennyiségén keresztül is. Ez nem áll ellentétben a 18. ábra megállapításaival, hogy az ecetsav nincs hatással a biogáz hozamokra, mivel ebben az esetben az *E. cloacae* sejtek által a rendszerben a hidrogén mennyisége is megnövekedett, vagyis a metanogén mikrobák működése aktívabbá vált, amelyet fokozott ecetsav felhasználás követett. Az ecetsav fermentációhoz a szubsztrátban jelen kell lennie nagy mennyiségű szénforrásnak, így tehát valószínűsíthetően minél magasabb a biomassa C/N nitrogén aránya annál több ecetsav fermentálódhat, melynek következtében a metanogén mikrobák aktivitása nagyobb mértékben fokozódhat.

A fermentációt követően meghatároztam, hogy a szubsztrát biomassa mekkora mértékben bomlott le (26. ábra). 100%-nak az adott biomassa teljes szervesanyag tartalma értendő. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a szerves száraz tömegre normált gázhozamok, valamint a biomassa lebomlási aránya között összefüggés fedezhető fel. Nagyobb gázkihozatali értékek esetében nagyobb biomassa lebomlási arány volt detektálható. A biogáz a szubsztrát biomasszában lévő szervesanyagok felhasználása segítségével keletkezik, így tehát ha a mikrobák hatékonyabban képesek hasznosítani az adott szubsztrátot magasabb biogáz hozamok várhatóak, mely a nagyobb mértékű biomassa lebomlási arányra vezethető vissza. A C/N aránynál felfedezhető összefüggés a hidrogén termelő törzsek használatakor itt is megfigyelhető (27. ábra), vagyis minél nagyobb mértékű volt az intenzifikáció annál nagyobb mértékű volt a biomassa lebomlási aránya közötti különbség.



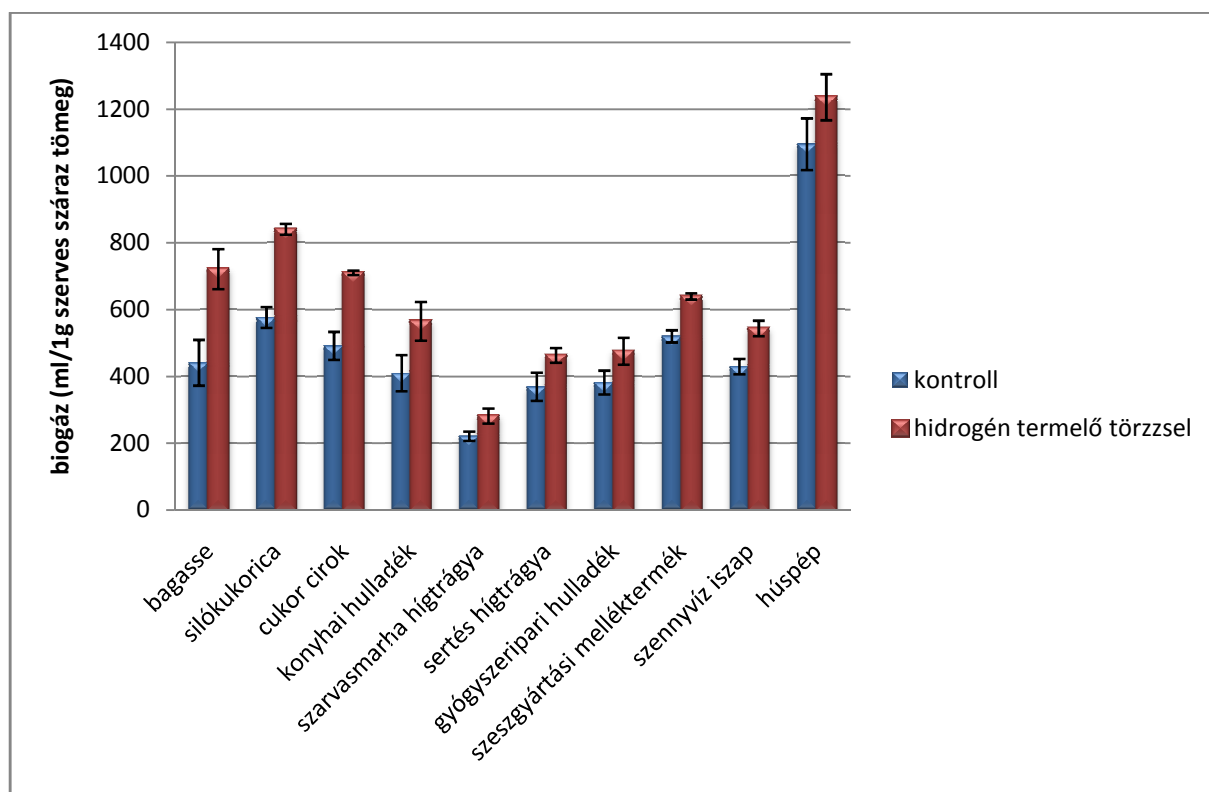
26. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált biomassza lebomlás arányok mezofil hőmérsékleten



27. ábra: Batch fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált többlet biogáz hozamok és szervesanyag lebomlási arányok mezofil hőmérsékleten

5.2.3. Batch üzemű fermentációk termofil hőmérsékleten

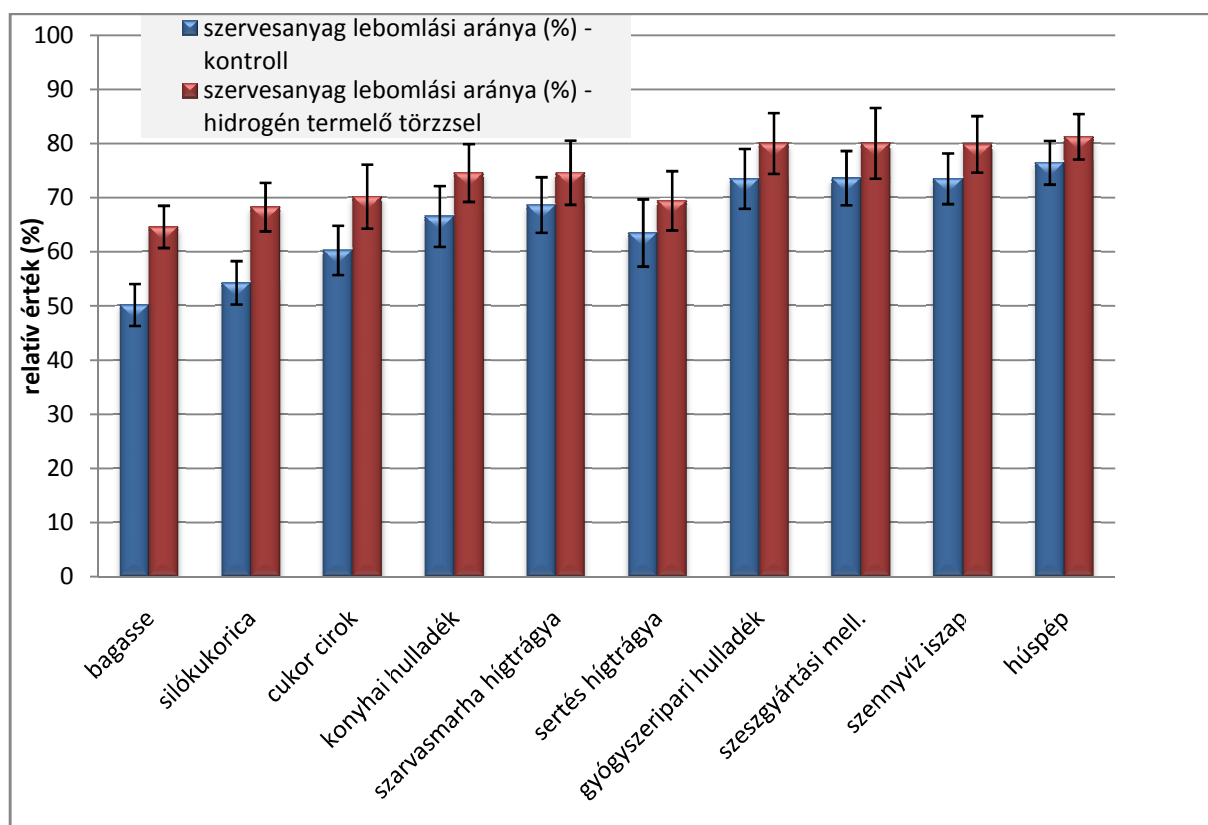
A termofil hőmérsékleten elvégzett batch fermentációk eredményei összhangban vannak a mezofil hőmérsékleten kapottakkal. A különböző típusú szubsztrátokon eltérő biogáz hozamokat detektáltunk (28. ábra). Ebben az esetben is a húspép bizonyult a mikrobák által leginkább hasznosítható biomasszának, a szarvasmarha hígtrágya eredményéből következtethetően az alacsony tápanyag tartalommal rendelkezett. A gázhozamok abszolút értékeit összehasonlítva az fedezhető fel, hogy termofil hőmérsékleten kis mértékben nagyobb gázhozamok detektálhatóak. Ez köszönhető a magasabb hőmérsékleten gyorsabbá váló anyagcsere folyamatoknak, a termofil mikroba konzorcium hatékonyabban tudta kiaknázni a biomasszában elraktározott energiát.



28. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok termofil hőmérsékleten

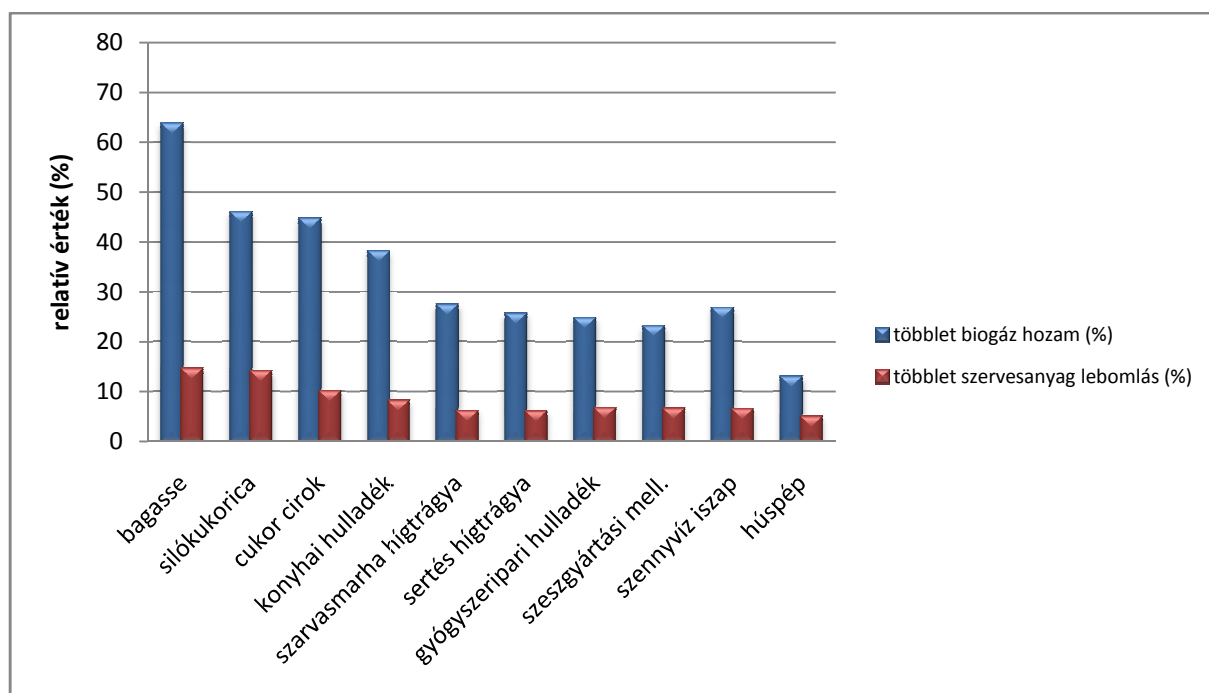
A *C. saccharolyticus* alkalmazása szintén sikeres volt, az általa leoltott fermentorokban megnövekedett gázhozamokat detektáltunk a kontroll fermentorokhoz képest. Az intenzifikáció mértéke, akárcsak mezofil hőmérsékleten függ a szubsztrát biomassza C/N

arányától, a nagyobb C/N aránnyal rendelkező szubsztrát fermentációjakor nagyobb gázhozam többleteket mértem (30. ábra). Ennek feltételezett oka a mezofil hőmérsékleten leírtakkal azonos. A gázhozam többletek a mezofil hőmérsékleten tapasztaltakkal összehasonlítva kisebbnek bizonyultak. A termofil mikroba konzorcium a magasabb hőmérséklet következtében valószínűleg hatékonyabban tudja hasznosítani a rendelkezésre álló szubsztrátokat, így a hidrogén termelő törzs alkalmazása nem tudja olyan mértékben megnövelni a metanogének aktivitását, mint mezofil hőmérsékleten.



29. ábra: Batch üzemű fermentáció során detektált szervesanyag lebomlási arányok termofil hőmérsékleten

A szervesanyag lebomlási arányával kapcsolatosan ugyanaz mondható el, mint mezofil hőmérsékleten, vagyis minél nagyobb gázkihozatali értékeket kaptam annál nagyobb volt a szervesanyag lebomlási aránya (29. ábra). A hidrogén termelő törzzsel leoltott fermentorokban a szervesanyag lebomlási többletek kisebbnek bizonyultak, mint mezofil hőmérsékleten (30. ábra).

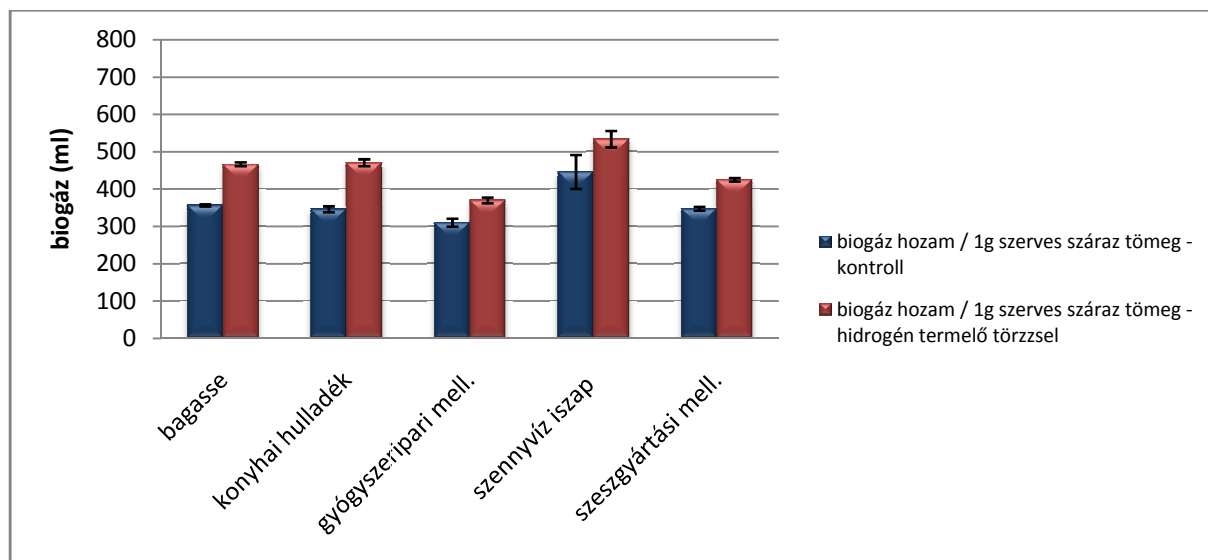


30. ábra: Batch fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált többlet biogáz hozamok és szervesanyag lebomlási arányok termofil hőmérsékleten

5.3. Folyamatos üzemű biogáz fermentációs mérések

A batch fermentációk pozitív eredményeit követően fontosnak tartottam meghatározni, hogy folyamatos üzemű fermentorokban is kifejtik-e gázhozam fokozó hatásukat a hidrogén termelő törzsek. A méréseket 5 literes térfogatú, teljesen automatikus vezérlésű reaktorokban végeztem el. A különböző fizikai paraméterek, illetve a keletkezett gázmennyiségek rögzítése minden 6. órában történt. A fermentációkat oltóiszappal indítottam el, majd megvártam az egyensúlyi állapot létrejöttét, vagyis mikor a 6 óránként mért gázhozamok egyenletes értéket mutattak. Ez a felfutási időszak a különböző szubsztrátok esetében eltérő volt, 14-30 nap között változott. Az egyensúlyi állapot létrejöttét követően 100 mintavételi pontot vettem fel (100x6óra), mely adatok elegendő információt nyújtottak a pontos kiértékeléshez (5. melléklet, 6. melléklet). Ekkor leoltottam a fermentorokat a hidrogén termelő törzsekkel és rögzítettem a keletkező biogáz mennyiségeket. A fermentációk során 5 különböző szubsztrátot használtam fel, melyek a következők voltak: bagasse, konyhai hulladék, gyógyszeripari melléktermék, szennyvíz iszap, szeszgyártási melléktermék. A tartózkodási időt minden esetben 25 napra állítottam be.

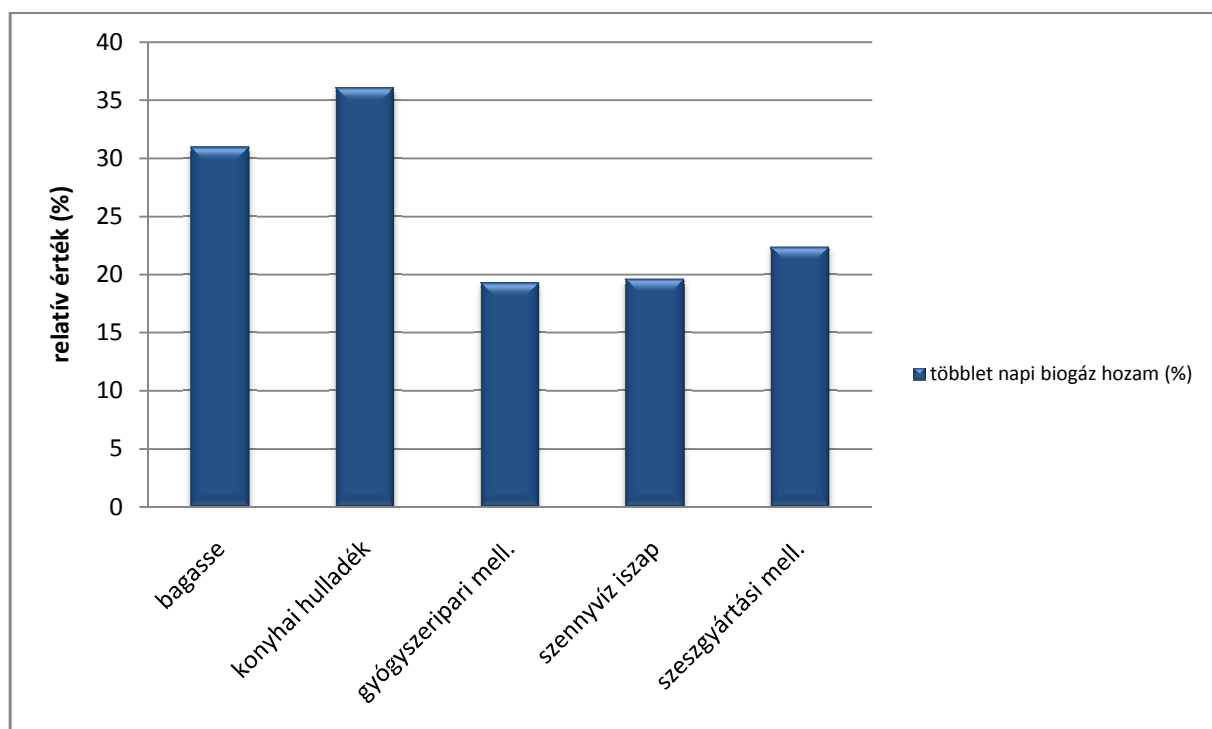
5.3.1. Folyamatos üzemű fermentációk mezofil hőmérsékleten



31. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok mezofil hőmérsékleten

Az egyes szubsztrátokból kapott gázkihozatali értékek (31. ábra) elmaradnak a batch fermentációnál kapott értékektől (25. ábra), mely annak köszönhető, hogy míg a batch fermentációban a biomassa csaknem teljes, mikrobák által hasznosítható része elbomlik, addig a folyamatos üzemben dolgozó reaktoroknál ez nem lehetséges, mivel mindig van friss biomassa bevitel és lefermentált biomassa eltávolítás. A fermentációk során a hidrogén termelő törzs alkalmazása mindegyik szubsztrát esetében megnövekedett biogáz hozamokat produkált (31. ábra). Várakozással ellentétben a megnövekedett gázhozamok nem bizonyultak tartósnak, a leoltást követően az intenzifikáció mértéke az idő előrehaladtával csökkent (5. melléklet). Ezen megfigyelés azt jelzi, hogy a hidrogén termelő törzs nem volt képes szaporodni a reaktorban, a sejtek nem voltak képesek beilleszkedni a természetes mikroba konzorciumba, a rendszerből kihígultak. Abban az esetben, ha a hidrogén termelő sejtek szaporodni ugyan képesek a rendszerben, csak jóval lassabban, mint a számukra optimális tápoldatban, a biomassa reaktorban való tartózkodási idejének növelésével el lehet kerülni, hogy a rendszerből a fermentációs maradék eltávolításakor kikerülő hidrogén termelő sejtek mennyiségét szaporodásukkal ne legyenek képesek pótolni. A retenciós idő 45 napra növelésével sem lehetett elkerülni a hidrogén termelő sejtek rendszerből való kihígulását, így igen valószínűnek tűnik, hogy azok nem voltak képesek szaporodni. Hatásukat csak addig lehet detektálni, ameddig a sejtek életképesek, elpusztulásukat követően a lefermentált biomasszával kiürülnek a reaktorból. A hidrogén termelő törzsek hatására megnövekedett

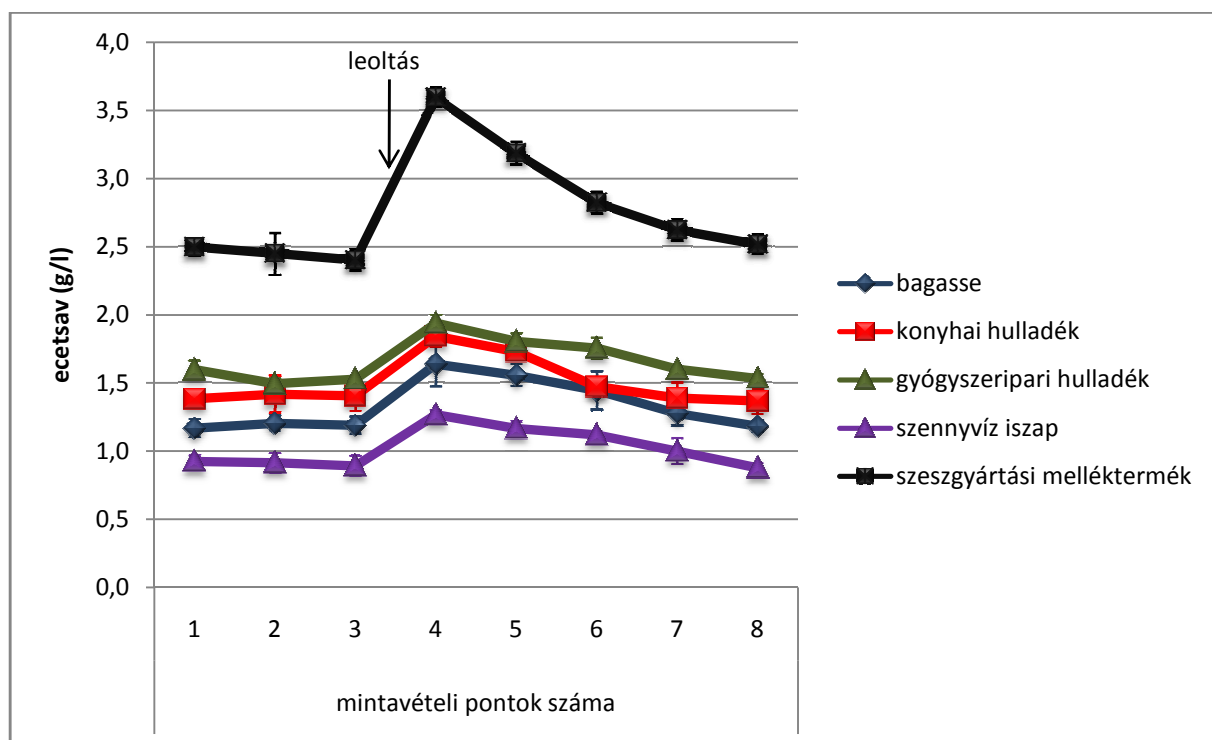
gázhozam adatok kiértékelése a leoltást követően 90 mintavételi pontig történt (ekkor a gázhozam értékek visszaestek a kontroll szintre). Ez alapján elmondható, hogy a hidrogén termelő törzsek hatására létrejött biogáz hozam többletek (32. ábra) elmaradnak a batch fermentációknál tapasztaltakkal ugyanazon szubsztrát esetében, melynek oka, hogy a lefermentált biomassza eltávolításakor hidrogén termelő sejtek is kikerültek a reaktorból, ellentétben a batch fermentációval, ahol nem történt biomassza eltávolítás. Az eredmények nem mondanak ellent a batch fermentációban tapasztaltakkal, ott a megfigyeléseket 30 napig végeztük, biomassza eltávolítás nem történt a reaktorokból, így ameddig az életképes sejtek hidrogént tudtak átadni a metanogén törzseknek, addig megnövekedett gázhozamok voltak detektálhatóak.



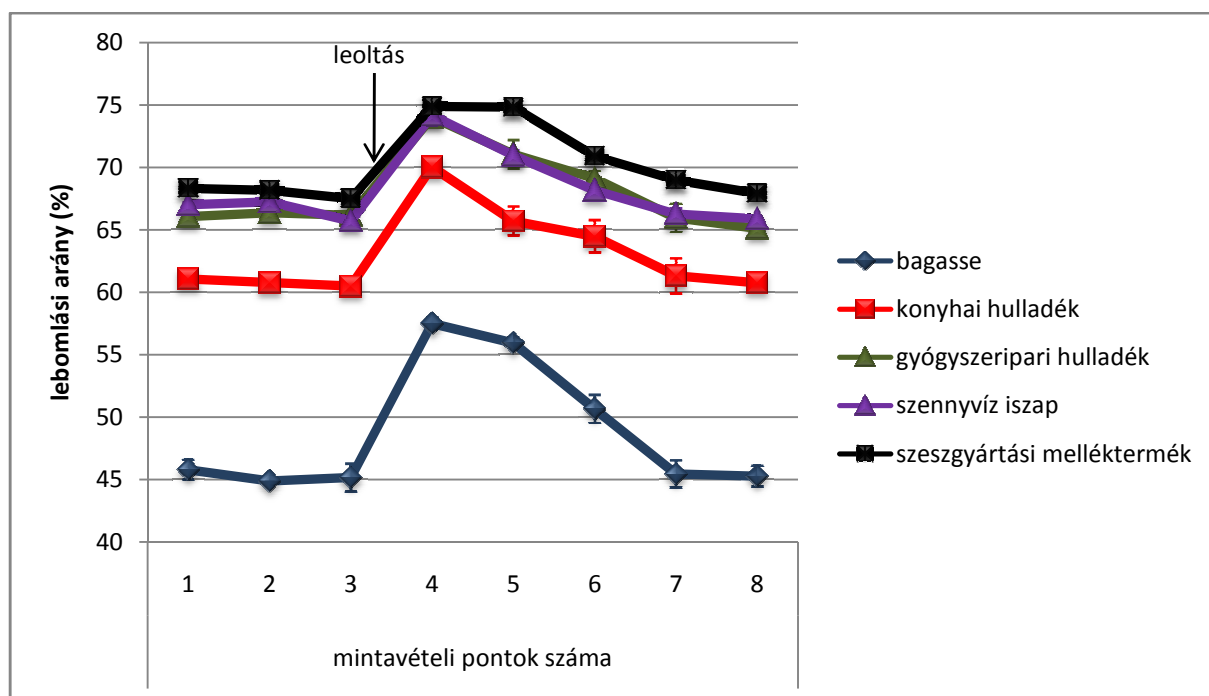
32. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált többlet biogáz hozamok mezofil hőmérsékleten

A folyamatos üzemű fermentáció során rögzített ecetsav koncentrációk (a fermentáció minden 5. napján), illetve szervesanyag lebomlási arányok is jól mutatják, hogy a hidrogén termelő törzsek a leoltást követően fokozatosan elveszítették aktivitásukat (33. ábra, 34. ábra). A leoltás után mind az ecetsav, mind a szervesanyag lebomlási arány megnövekedett, de ahogy a sejtek hígultak a rendszerből ezen értékek visszaestek a kontroll szintre. Az ecetsav koncentráció megnövekedése a hidrogén termelő sejteknek köszönhető, ugyanis ahogyan azt

korábban bemutatam azok fermentatív tevékenysége során a hidrogén mellett ecetsav is keletkezik. A szervesanyag lebomlási aránya összhangban van a gázkihozatali értékekkel, minél nagyobb a szervesanyag lebomlási aránya annál nagyobb gázkihozatali értékek detektálhatóak. A szervesanyag lebomlási többletek alacsonyabbak a megfelelő batch fermentációknál tapasztaltakkal, melynek háttérében ismét a technológiából adódó különbségek állnak.



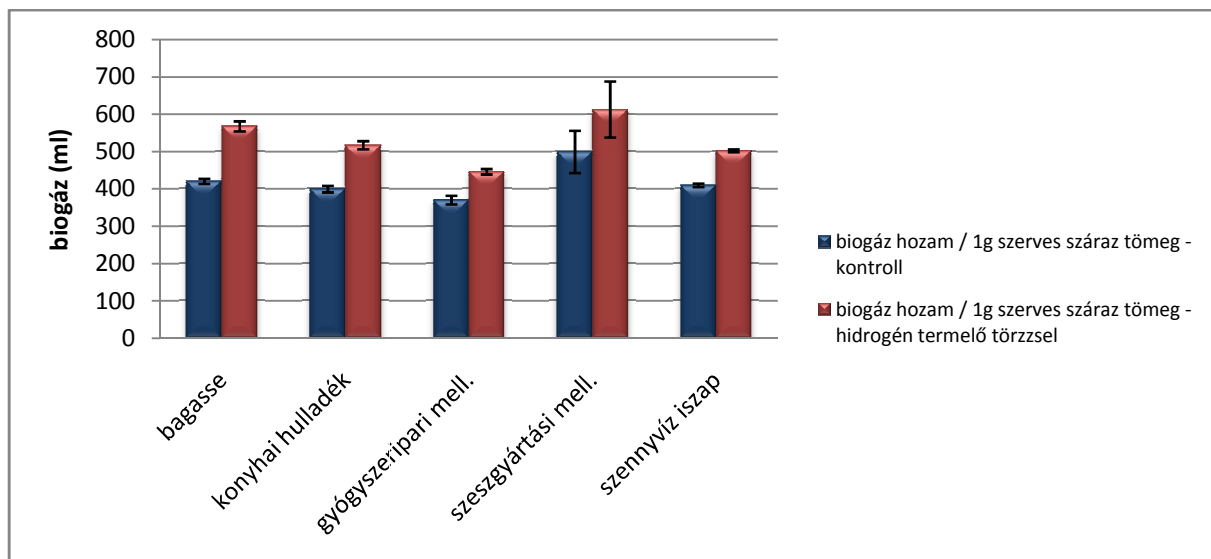
33. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált ecetsav koncentráció változások mezofil hőmérsékleten



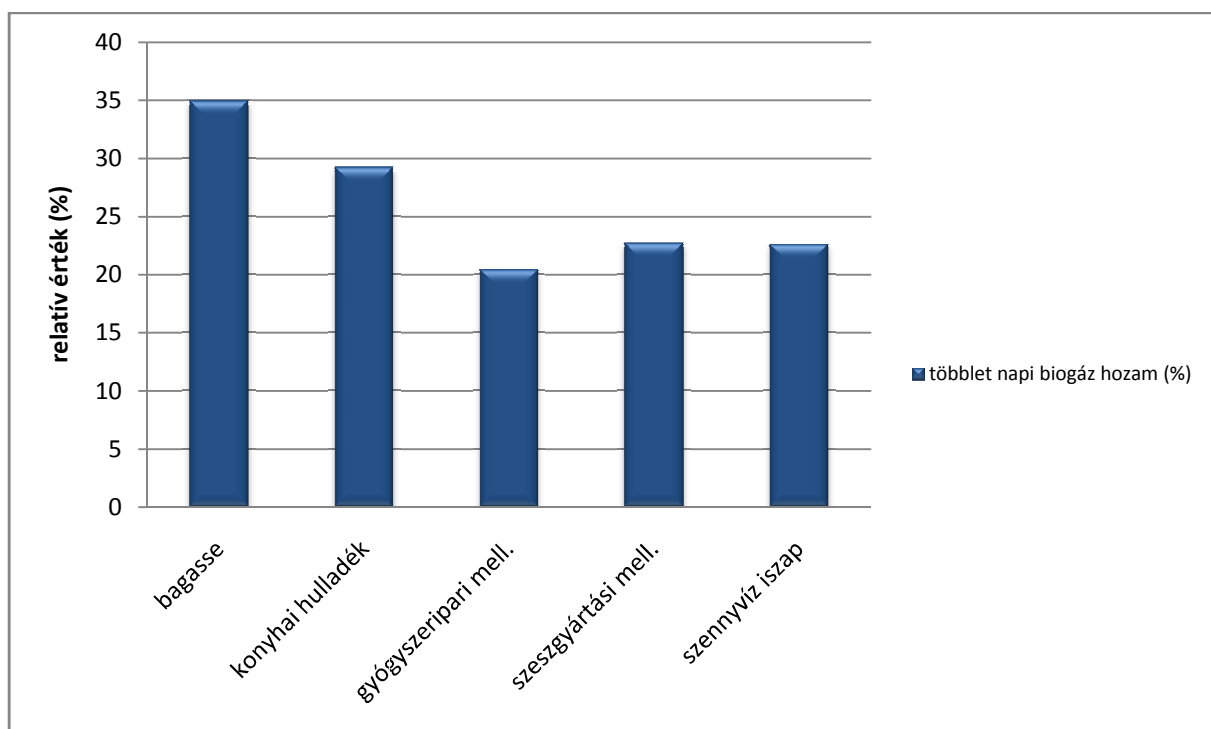
34. ábra: Folyamatos fermentáció során detektált szervesanyag lebomlási arányok mezofil hőmérsékleten

5.3.2. Folyamatos üzemű fermentációk termofil hőmérsékleten

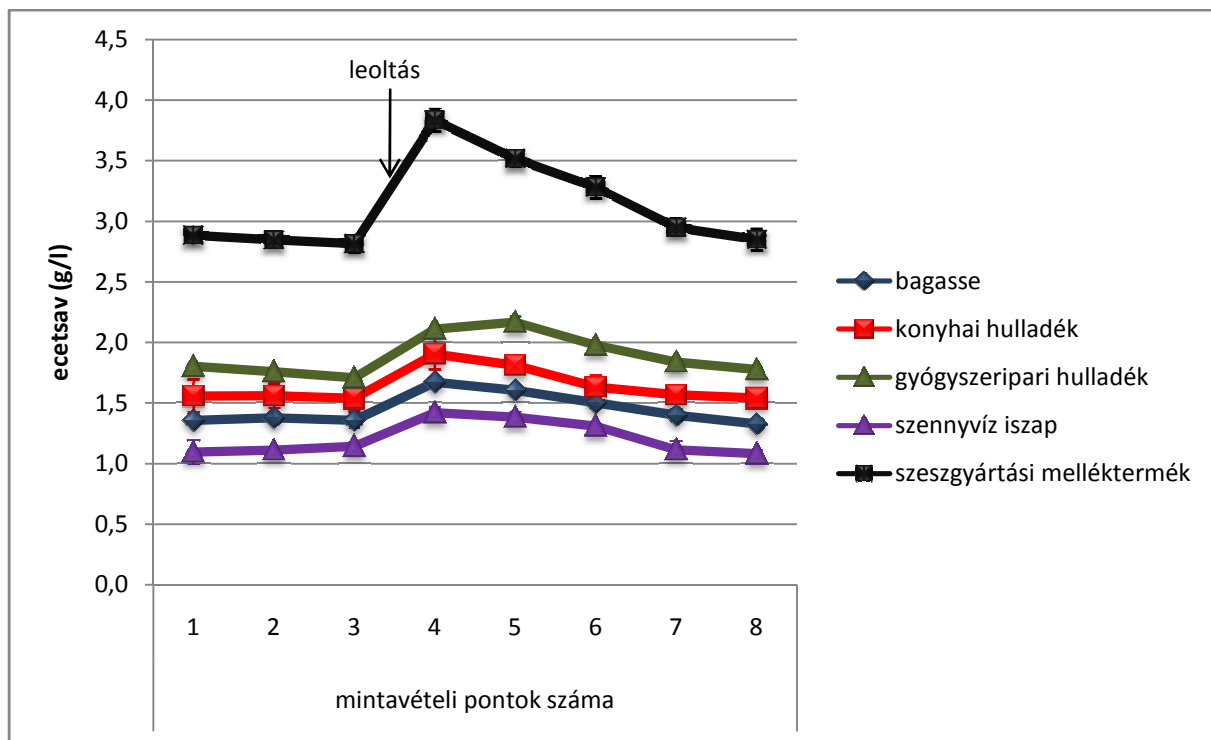
A termofil hőmérsékleten elvégzett folyamatos üzemű fermentációk eredményeivel kapcsolatban ugyanaz mondható el, mint mezofil hőmérsékleten. A gázkihozatali értékek, valamint a hidrogén termelő törzsek által okozott gázhozam többletek alacsonyabbak, mint a megfelelő batch méréseknél (35. ábra, 36. ábra). A hidrogén termelő törzsek nem voltak életképesek a rendszerben, azok kihígulása volt tapasztalható (6. melléklet). Az ecetsav koncentráció, valamint a szervesanyag lebomlási aránya a leoltást követően megnövekedett, azonban a hidrogén termelő sejtek kihígulásával párhuzamban visszatértek a kontroll szintre (37. ábra, 38. ábra). A szervesanyag lebomlási aránya alacsonyabb, mint a megfelelő batch fermentáció esetében.



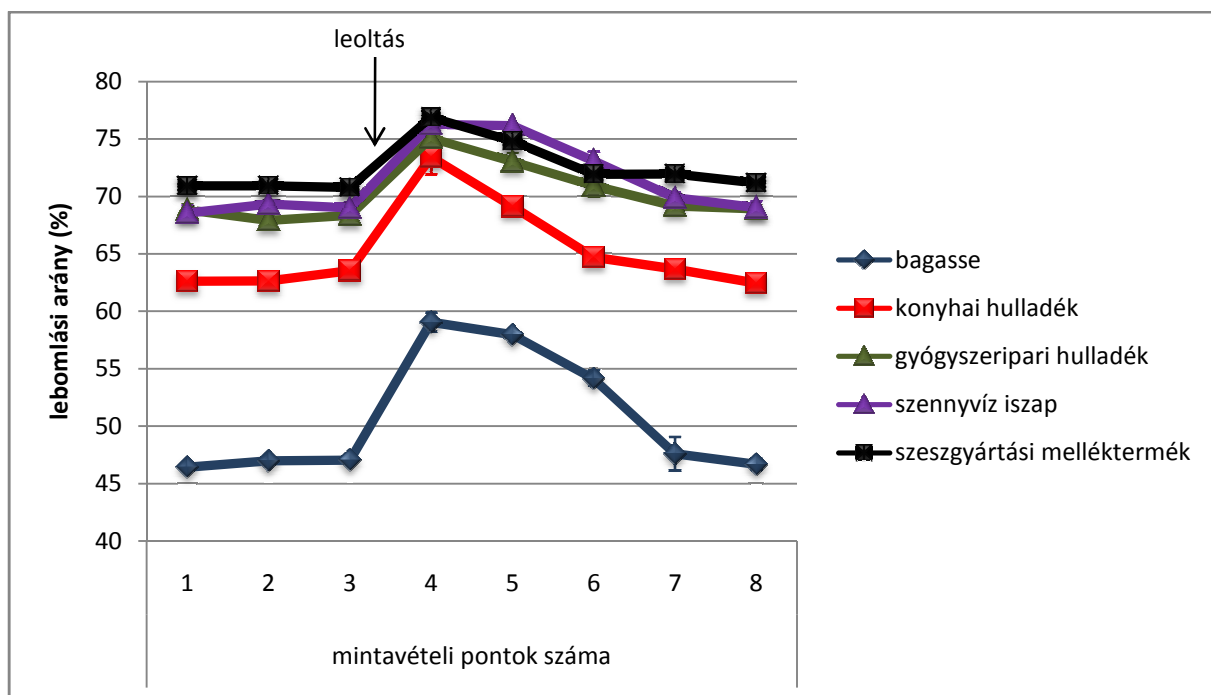
35. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során detektált biogáz hozamok termofil hőmérsékleten



36. ábra: Folyamatos üzemű fermentáció során hidrogén termelő törzs alkalmazása mellett detektált átlagos többsz napi biogáz hozamok termofil hőmérsékleten



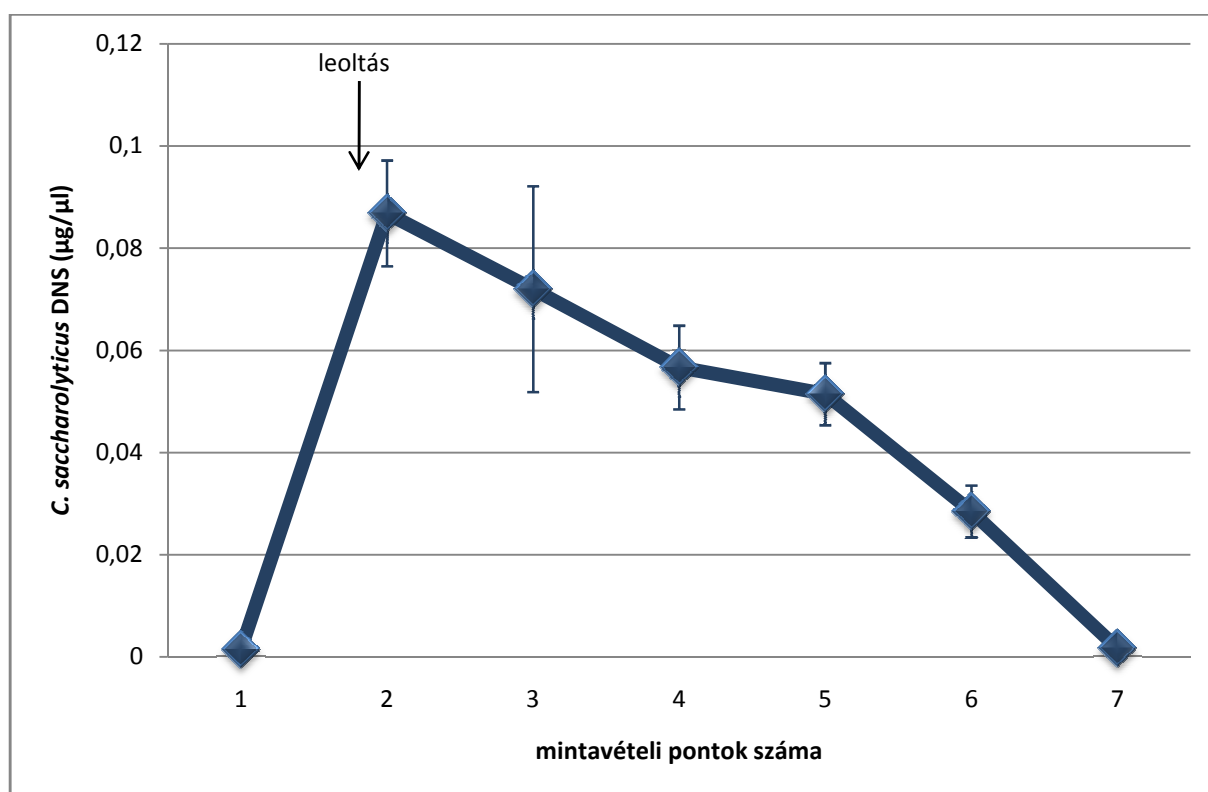
37. ábra: Folyamatos üzemi fermentáció során detektált ecetsav koncentráció változások termofil hőmérsékleten



38. ábra: Folyamatos üzemi fermentáció során detektált szervesanyag lebomlási arányok termofil hőmérsékleten

5.3.3. *C. saccharolyticus* sejtek mennyiségének nyomonkövetése a fermentáció során

Fontosnak tartottam meghatározni, hogy a folyamatos üzemű fermentorokban valóban kihígulnak-e a rendszerből a hidrogén termelő sejtek, vagy arról van szó, hogy a sejtek ugyan szaporodni képesek a reaktorban, csak valamilyen gátló faktor hatására hidrogén termelésük csökken, vagy az általuk termelt hidrogént nem képesek a metanogén törzsek hasznosítani. A *C. saccharolyticus* sejtek azonosítása kevert kultúrából klasszikus mikrobiológiai módszerekkel igen nehézkes, ezért molekuláris biológiai eljárást alkalmaztam. A reaktorokból 5 naponta mintát vettem, majd *C. saccharolyticus* specifikus primerek és Real Time PCR segítségével meghatároztam a fermentorban lévő termofil hidrogén termelő sejtek DNS-ének mennyiségét, melyből következtetni lehet azok sejt számának alakulására (39. ábra). Az 1. mintavételi pont a leoltást megelőző állapotot tükrözi, míg a 2. mintavétel közvetlenül a leoltást követő állapotot. Amint az ábráról leolvasható a *C. saccharolyticus* sejtek DNS-ének mennyisége az idő előrehaladtával csökkent, mely azt mutatja, hogy a sejtek a reaktorban nem voltak életképesek, onnan valóban kihígultak, a leoltást követően mintegy 25 nap elteltével már nem volt mérhető mennyiség a fermentorban.



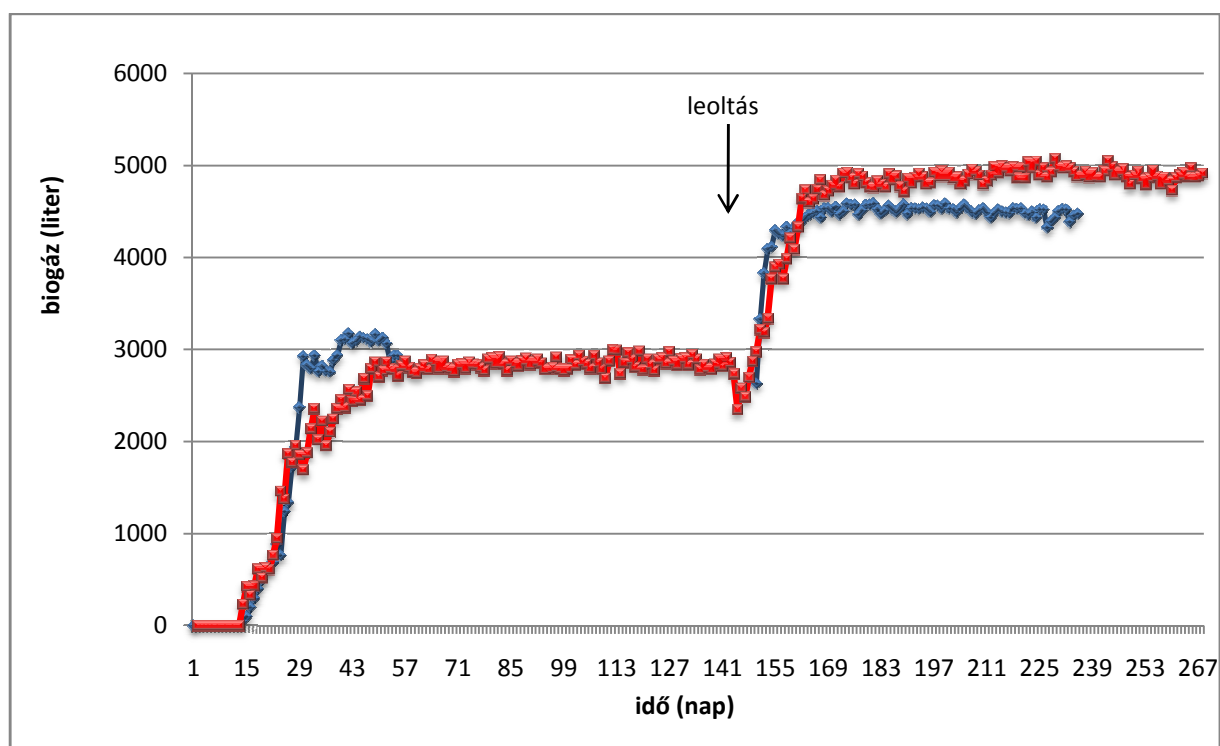
39. ábra: Hidrogén termelő törzs mennyiségének alakulása folyamatos üzemű fermentáció során

5.4. Léptéknövelő kísérletek

5.4.1. Biogáz fermentáció 5m³-es térfogatban

A laboratóriumi léptékben elvégzett méréseket követően szükségesnek láttam az eljárás elvégzését kisüzemi léptékben. Egy sertéstartó telepet választottunk a kísérletek elvégzésének helyszínéül, ahol egy 5m³-es reaktortérfogattal rendelkező folyamatos üzemű fermentort állítottunk fel, melyben sertés hígtrágya képezte a szubsztrátot. Két, egymástól független mérést végeztünk. A méréssorozatok alkalmával a fermentációt a Nyírbátori Bátortrade Kft. nyírbátori biogáz üzeméből származó fermentációs maradék segítségével indítottuk el. Egy rövid felfutási időszakot követően a napi gázhozamok egy konstans értékre álltak be. A napi gázhozam értékeket a 40. ábra mutatja. A kontrol értékek felvételét követően *C. saccharolyticus*-al oltottuk le a fermentort. A napi biogáz hozamok igen nagymértékben, 60-70 v/v%-os arányban megnövekedtek a kontroll értékekhez képest, és ezek a gázhozamok az 5 literes fermentorokban tapasztaltaktól eltérően, tartósan detektálhatóak voltak 4 hónapon keresztül. Ezen időtartam alatt az eredetileg beadagolt hidrogén termelő törzs 300.000-szeresére hígult, abban az esetben, ha nem szaporodott, mivel naponta a fermentorban lévő biomassza 10%-t cseréltük friss sertés hígtrágyára. Mindez azt jelenti, hogy ebben a rendszerben a *C. saccharolyticus* sejtek képesek voltak beilleszkedni a természetes mikroba konzorciumba, valamint ott megfelelő ütemben szaporodni tudtak, ellenkező esetben a kihígulásukat követnie kellett volna a biogáz termelés csökkenésének. Az első méréssorozat eredményei egy év múlva megismételhetőek voltak, ami azt bizonyítja, hogy a biogáz fermentáció intenzifikálása tartósnak és reprodukálhatónak bizonyult. Az 5 literes fermentorok eredményeinél jóval sikeresebb kísérleti eredményekre, illetve a két rendszer eltérő viselkedésére pontos választ nem találtam. A sertés hígtrágya valószínűsíthetően tartalmaz olyan tápanyag komponenszt, mely az 5 literes fermentorokban alkalmazott szubsztrátokban nem található, valamint figyelembe kell venni azon tényt, hogy a fermentációs technológiában eltérések mutatkoznak. A reaktor keverése az 5m³-es fermentorban szivattyú segítségével történt, míg az 5 literesek esetében keverőlapáttal. Valószínűsíthető, hogy a szivattyú segítségével történő keverés során nem léptek fel olyan nyíró erők, melyek a hidrogén átadásához elengedhetetlenül szükséges mikroba aggregátumokat szétválasztották. Ezért megvizsgáltam, hogy a keverőlapátok fordulatszámának változtatása milyen hatással bír a mikroba konzorciumokra, azonban szignifikáns különbség nem volt tapasztalható a biogáz hozamokban. A reaktor geometria, és

az alkalmazott retenciós idők között nem volt lényegesnek tűnő különbség. További magyarázatként vetődik fel a fermentorok anyagának eltérő összetétele. Az 5 literes reaktorok rozsdamentes acélból, míg az 5m³-es reaktor műanyagból készült. A fermentáció során az acélból kioldódó vas ionok gátolhatják a *C. saccharolyticus* szaporodását, azonban a kísérleti eredmények azt mutatták, hogy még 100mg/l vas koncentráció mellett is életképesek a sejtek. A fermentáció során a reaktorokból vett folyadékminták Fe koncentrációja azonban nem haladta meg ezt az értéket.

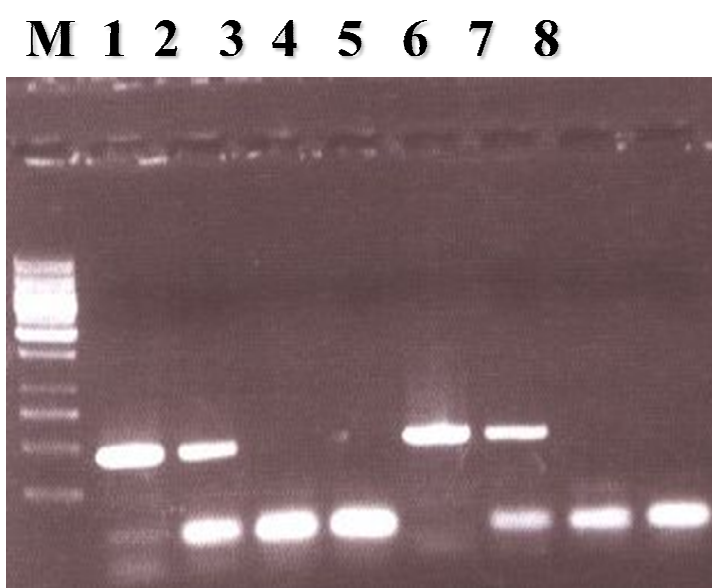


40. ábra: Folyamatos üzemi fermentáció 5m³-es térfogatban
(piros görbe: 1. mérés sorozat, kék görbe: 2. mérés sorozat)

5.4.2. Hidrogén termelő törzs azonosítása a fermentációs maradékban

Igen fontosnak tartottam meghatározni, hogy a léptéknövelés során leoltott *C. saccharolyticus* sejtek a 4 hónap elteltével megtalálhatóak-e a fermentorban, mivel a jelenléte alátámasztaná, hogy valóban a hidrogén termelő sejtek felelősek a megnövekedett gázhozamokért. A klasszikus mikrobiológiai módszerek ez esetben is igen nehezen alkalmazhatóak, ezért molekuláris biológiai módszereket használtam a hidrogén termelő sejtek jelenlétének kimutatására. A fermentáció befejezését követően mintát vettem a fermentorból, majd abból összes DNS-t izoláltam, amely templátként szolgált a PCR

reakciókban. Specifikus DNS markereket használtam, hogy szaporítsam a *C. saccharolyticus* DNS-ét. Két független *C. saccharolyticus* specifikus DNS fragmentet is sikeresen sokszoroztam fel, a 41. ábra mutatja a PCR reakciók eredményeit. A fermentációt megelőzően vett mintákban a hidrogén termelő sejt DNS-e nem mutatható ki, míg 4 hónap elteltével, a fermentáció leállítását követően detektálható volt. A PCR termék szekvenálását követően a fragment 100%-os egyezést mutatott a *C. saccharolyticus* DNS szekvenciájával. A mérések egyértelműen igazolták, hogy a hidrogén termelő törzs képes volt beilleszkedni a természetes mikroba konzorciumba, ott megfelelő ütemben tudott szaporodni.



41. ábra: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* azonosítása a fermentációs maradékban
(1-4: PCR termékek *echA* specifikus primerekkel, 5-8: PCR termékek *celA* specifikus primerekkel, M: molekula tömeg marker, 1 és 5: *C. saccharolyticus* DNS templát, 2 és 6: a fermentáció befejezésekor vett mintákból izolált DNS templát, 3 és 7: *C. saccharolyticus* leoltását megelőzően vett mintából izolált DNS templát, 4 és 8: negatív kontroll)

6. Összefoglalás

A dolgozatban bemutattam, hogy a hidrogén jelentős szerepet játszik az anaerob biogáz fermentációban. A hidrogén koncentráció, valamint a sejtek közötti hidrogén transzfer jelentős szabályozó hatással rendelkezik a mikrobiális anyagcsere folyamatok során.

A dolgozatomban bemutattam, hogy szignifikáns növekedés tapasztalható a természetes kevert metanogén konzorcium által előállított biogáz mennyiségében, ha a rendszerbe egy megfelelően kiválasztott hidrogén termelő törzset juttatok be, mely igaz mezofil és termofil hőmérsékletre is. A mérések eredményei egyértelműen igazolták, hogy ez a pozitív hatás csak abban az esetben jön létre, ha a hidrogén termelő törzsek direkt kölcsönhatásba kerülnek metanogén partnereikkel. Az intenzifikáció nem szubsztrát függő, számos, egymástól alapvető összetételében igen eltérő alapanyagon, vagyis nagyban különböző metanogén konzorciumokon igazoltam annak létrejöttét.

A dolgozatban bemutatott eredmények azt bizonyítják, hogy csak abban az esetben lehetséges az intenzifikáció, ha a biogáz fermentációért felelős konzorcium, valamint a hidrogén termelő törzs szoros kontaktusban áll egymással. Külső forrásból adagolt hidrogén gáz nem volt hatással a fermentációra. Hővel inaktivált, valamint hidrogén termelésre képtelen sejtek szintén hatástalannak bizonyultak.

A hidrogénen kívül minden heterotróf szervezet szén-dioxidot is termel. Ez elméletileg hatással lehet a biogáz képződésre, ugyanis a hidrogenotróf metanogének metánt állítanak elő hidrogénből és szén-dioxidból. Mindezek ismeretében sem tartom valószínűnek, hogy a szén-dioxid szerepet játszhat a biogáz termelés fokozásában, ugyanis a végtermékben a szén-dioxid igen nagy feleslegben található (35-45%), valamint a mérések során szignifikáns különbséget nem tapasztaltam a CO₂ koncentrációjában. A végtermékben hidrogén igen kis mennyiségben volt megtalálható, ami szintén megerősíti, hogy az extra biogáz mennyiségért ez a molekula a felelős.

Az szervesanyagok anaerob lebomlása során a hidrogén koncentrációja jóval alacsonyabb, mint az ecetsavé. Az ecetsav koncentráció megfelelően működő rendszerekben 10^{-4} – 10^{-1} M között változik, míg a hidrogén koncentráció 10^{-8} – 10^{-5} M közé tehető, vagyis mintegy 4 nagyságrenddel alacsonyabb. Mindezek mellett a hidrogén parciális nyomása igen gyorsan változhat, akár egy nagyságrenddel is mindössze néhány perc alatt, melynek oka annak igen gyors forgalma (Kovács és Polyák 1991).

Az alacsony szabad hidrogén koncentráció a fermentorban hatással van a rendszerben a hidrogén forgalmára (Bryant, és mtsai. 1967, Ahring és Westermann 1988). Tipikus esetben

a hidrogén turnover-e $6,8 \times 10^6$ /nap, vagy 80/s. A sejtek közötti hidrogén átvitel ezért igen gyors, érzékeny folyamat, emellett sebesség meghatározó lépés. Mikrobiális környezetben a hidrogén sejtek közötti transzportjának fő mechanizmusa a diffúzió. Számítások alapján elmondható, hogy az optimális távolság a hidrogén termelő és hidrogén felhasználó fajok között $10 \mu\text{m}$ parciális körülmények között. Ez a távolság mintegy 10 bakteriális sejt méretével egyezik meg. Mindezekből világosan következik, hogy a folyamatban részt vevő bakteriális sejteknek igen közel kell lenniük egymáshoz, ellenkező esetben a sejtek közötti hidrogén transzfer a fő sebesség meghatározó lépés az egész folyamatban. Ideális esetben egy keverővel ellátott bioreaktorban a bakteriális sejtek, valamint a szubsztrát, és a termék molekulák egyenletesen elosztva találhatóak meg (Miron, és mtsai. 2000).

Néhány korábbi tanulmány (Bryant, és mtsai. 1967, Bernstead, Archer és Lloyd 1990, Schmidt és Ahring 1993) a kevert metanogén kultúrák mikrobái, valamint a szulfát redukáló baktériumok elektron forrásért történő versengését írja le.

A dolgozatomban leírt kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a hidrogén termelés növekedése, valamint annak sejtek közötti megfelelő átadása a szintropikus kapcsolatban álló fajok között a biogáz termelést növeli. Felismertem, hogy a heterotróf fermentációt folytató szintropikus partnerek által *in situ* termelt hidrogén segíti a metanogenezis komplex folyamatának intenzifikálását. Ezen eredmény nem mond ellent a korábbi kutatási eredményeknek, melyekben a külső forrásból rendszerbe bejuttatott hidrogén biogáz fermentációra gyakorolt gátló hatását mutatták ki (Bryant, és mtsai. 1967, Ahring, Wetermann és Mah 1991).

A hidrogén és szén-dioxid mellett a harmadik fő fermentációs termék az ecetsav. Ezért megvizsgáltam, hogy a reaktorban az acetát koncentráció megemelkedése okozhatja-e a biogáz termelés növekedését. Na-acetátot adagoltam a biogáz termelő konzorciumhoz $20\text{--}50\text{mM}$ -os koncentráció tartományban a pH ellenőrzése mellett, melynek azonban nem volt kimutatható hatása a keletkező biogáz mennyiségére.

A metanogén törzsek összetételének előnyös változása szintén felelős lehet a megnövekedett biogáz hozamért. Mesterségesen előidézett változás a fajok egymáshoz való arányában eredményezhet eltérő fermentációs aktivitást (Fernandez, és mtsai. 2000, Hashsham, és mtsai. 2000). Igen valószínűtlen hogy a hidrogén termelő törzsek leoltását követően hasonló változás történik a metanogén törzsek populáció mintázatában, ráadásul mezofil és termofil hőmérsékleten egyaránt.

Hasonlóképpen, a hangyasav képződés, mint előnyös mechanizmus nem tűnik valószínűnek, mivel a hangyasav keletkezésért leginkább felelős etanol és tejcukor (Thiele és

Zeikus 1988b) nincs számottevő mennyiségben a használt szubsztrátokban, valamint a két hidrogén termelő törzs anyagcsere útvonalai jelentősen eltérőek. Habár az *E. cloacae* tartalmazza a piroszőlősav-formát-liáz és formát-hidrogén-liáz enzim komplexeket, a *C. saccharolyticus*-ban ezek az enzimek nem találhatók meg. Mivel a hozamnövekedést mindkét törzs alkalmazása során tapasztaltam hasonló mechanizmusoknak kell végbemennie mind mezofil, mind termofil hőmérsékleten.

A hidrogén termelő törzsek biogáz fermentációra gyakorolt intenzifikáló hatását bemutattam mind batch, mind folyamatos üzemű fermentorokban. A folyamatos üzemű fermentorokban a hatás csak ideiglenes, ott a sejtek tartósan nem életképesek, kihígulnak a rendszerből. Bemutattam, hogy az eltérő C/N aránnyal rendelkező szubsztrátokon eltérő az intenzifikáció mértéke, a nagyobb C/N aránnyal rendelkező biomassza alkalmazásakor az intenzifikáció mértéke nagyobb. Az alkalmazott két hidrogén termelő törzs esetében azt találtam, hogy adott szubsztrát esetében mezofil hőmérsékleten a hidrogén termelő törzs alkalmazása nagyobb biogáz hozam többletet eredményez, mint termofil hőmérsékleten. További kísérleteknek kell eldöntenie, hogy ez mennyire fajspecifikus. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a hidrogén termelő törzs használata esetén a mikrobák nagyobb hatékonysággal képesek a biomasszát hasznosítani, a szervesanyag lebomlási aránya minden szubsztrát esetében megnő.

A méréseket termofil hőmérsékleten kisüzemi léptékben, 5m³-es térfogatú folyamatos üzemű fermentorokban is elvégeztem. Ezeket a kísérleteket csaknem 1 éven keresztül, két ismétlésben folytattam, ez elegendően hosszú idő ahhoz, hogy üzemi körülmények között ellenőrizsem, vajon a hidrogén termelő baktériumok be tudnak-e illeszkedni a természetes kevert mikroba konzorciumba. Az intenzifikáció 4 hónapig folyamatosan kimutatható volt. PCR reakció segítségével igazoltam, hogy a kísérletben alkalmazott technológia mellett a termofil hidrogén termelő törzs életképes a rendszerben, 4 hónap elteltével a sejtek jelenléte egyértelműen igazolható volt.

Mezofil rendszerben az *E. cloacae* kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel nehézkes, ugyanis az *Enterobacteriaceae* család egyes tagjai megtalálhatóak a biogáz termelő természetes mikroba konzorciumban, illetve a szubsztrát biomasszában, ezért molekuláris markerek nem használhatóak. Ebben az esetben az *E. coli hypF* mínusz törzset alkalmaztam, és kimutattam, hogy a biogáz képződésre gyakorolt pozitív hatás csak az aktív hidrogenáz enzimet tartalmazó Eubacteriaceae törzs esetében volt tapasztalható. A *hypF* mutáció blokkolja az aktív hidrogenázok bioszintézisét, de a fermentatív folyamatban szerepet játszó egyéb enzimek funkciójukat megőrzik. A *hypF* mínusz törzzsel leoltott biogáz

fermentorokban nem volt tapasztalható többlet gázhozam a kontrollhoz képest, míg az aktív HypF fehérjét tartalmazó törzs esetében az intenzifikáció megvalósult. Meg kell jegyezni, hogy a *hypF* mutáns törzsben a formát-hidrogén-liáz enzim komplex szintén blokkolt, így hangyasav nem tud felszaporodni a rendszerben. Mivel ilyen körülmények között a biogáz termelés nem fokozódott a sejtek közötti hangyasav transzfer nem játszhatott szerepet az intenzifikáció létrejöttében (Thiele és Zeikus 1988).

Az eljárás ipari léptékben való alkalmazásához szükséges a hidrogén termelő törzsek minél gazdaságosabb tenyésztése, mely olcsó ipari tápoldatokon valósítható meg. Munkám során meghatároztam, hogy a *C. saccharolyticus* esetében a szójaliszt, míg az *E. cloacae* esetében a melasz bizonyult a legmegfelelőbb olcsó ipari tápnek.

A dolgozatban bemutatott biotechnológiai módszer az anaerob fermentáció során keletkező biogáz mennyiség fokozására ipari léptékben történő alkalmazása során szignifikáns csökkenés következhet be az ipari reaktorok beindítási, felfuttatási, valamint működtetési költségeinek tekintetében.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Kovács Kornélnak, Dr. Rákhely Gábornak munkám szakmai irányításáért, Ács Norbertnek, Dobó Krisztinának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért, valamint az SZTE Biotechnológiai Tanszéken dolgozó valamennyi kollegának, akik nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Irodalomjegyzék

- Achnich, C, A Schumann, T Wind, és R Conrad. Role of interspecies H_2 transfer to sulfate and ferric ion-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995b. 16:61-70.
- Achnich, C, F Bak, és R Conrad. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric ion reducers, sulfate reducers and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol Fertil Soils*, 1995a. 19:65-72.
- Ahring, BK. Perspectives for anaerobic digestion. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2003. 81:1-30.
- Ahring, BK, és P Westermann. Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Appl Environ Microbiol*, 1988. 54:2393-2397.
- Ahring, BK, P Wetermann, és RA Mah. Hydrogen inhibition of acetate metabolism and kinetics of hydrogen consumption by *Methanosarcina thermophila* TM-1. *Arc Microbiol*, 1991. 157:38-42.
- Alexander, M. Biodegradation of organic chemicals. *Env Sci Technol*, 1985. 19:106-111.
- Bagi, Z, K Perei, G Rákhely, és KL Kovács. Biotechnological procedure for the intensification of biogas production in a thermophilic system. Hungary. Szabadalom száma: P0402444/2004. 2004.
- Bai, A. *A biogáz*. Budapest: Száz magyar falu könyvesháza Kht., 2007.
- Bai, A. A biomassza energetikai hasznosításának jelene és tendenciái hazánkban. *DE-ATC-AVK Nemzetközi Konferencia*. Debrecen, 2003. 124-125.
- Bai, A, Z Lakner, B Marosvölgyi, és A Nábrádi. *A biomassza felhasználása*. Budapest: Szaktudás Kiadó Ház, 2002.
- Bálint, B, Z Bagi, A Toth, G Rákhely, K Perei, és K Kovács. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005. 69:404-410.
- Baresi, L., R:A: Mah, D.M. Ward, és I.R. Kaplan. Methanogenesis from acetate enrichment studies. *Appl Environ Microbiol*, 1978. 36:186-197.
- Barótfi, I. *Környezettechnika*. Mezőgazda Kiadó, 2000.
- Bartha, I. *A biogáz a jövő egyik megújuló energiaforrása*. Nyíregyháza: Bio-Genezis Kft., 2002.
- Beneman, JR. Hydrogen production by microalgae. *J Applied Physiology*, 2000. 12:291-300.
- Bernstead, J, DB Archer, és D Lloyd. Role of hydrogen in the growth of mutualistic methanogenic cocultures. In *Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in*

interspecies transfer, Eds: JP Bélaich, M Bruschi és JL Garcia. New York: Plenum, 1990.161-171

Boone, DR, és MP Bryant. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov. from methanogenic ecosystems. *Appl Environ Microbiol*, 1980. 40:626-632.

Bryant, MP, EA Wolin, MJ Wolin, és RS Wolfe. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch Microbiol*, 1967. 59:20-31.

Cappenburg, T.H. A study of mixed continuous cultures of sulfate-reducing and methane-producing bacteria. *Micro Ecol*, 1975. 2:60-72.

Cayol, JL, ML Fardeau, JL Garcia, és B Ollivier. Evidence of interspecies hydrogen transfer from glycerol in saline environments. *Extremophiles*, 2002. 6:131-134.

Celik, AN, T Muneer, és P Clarke. A review of installed solar photovoltaic and thermal collector capacities in relation to solar potential for the EU-15. *Renewable Energy*, 2008. in press.

Celik, AN, T Muneer, és P Clarke. A review of installed solar photovoltaic and thermal collector capacities in relation to solar potential for the EU-15. *Renewable Energy*, 2008. in press.

Conrad, R, F Bonjour, és M Aragno. Aerobic and anaerobic microbial consumption of hydrogen in geothermal spring water. *FEMS Microbiol lett*, 1985. 29:201-205.

Conrad, R, F Bonjour, és M Aragno. Aerobic and anaerobic microbial consumption of hydrogen in geothermal spring water. *FEMS Microbiol lett*, 1985. 29:201-205.

Conrad, R, FS Lupton, és JG Zeikus. Hydrogen metabolism and sulfate-dependent inhibition of methanogenesis in eutrophic lake sediment (Lake Mendota). *FEMS Microbiol Ecol*, 1987. 45:107-115.

Conrad, R, TJ Phelps, és JG Zeikus. Gas metabolism evidence in support of juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1985b. 50:595-601.

Das, D, és TN Veziroglu. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy*, 2001. 26:13-28.

Dolfing, J. Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrate concentrations, the influence of mass transfer limitation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985. 22:77-81.

Dolfing, J, és WGBM Blomen. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *J Microbiol Methods*, 1985. 4:1-12.

Fernandez, AS; Hashsham, SA; Dollhope, SL; Raskin, L; Glagoleva, O; Dazzo, FB; Hickey, RF; Criddle, CS; Tiedje, JM. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66:4058-4067.

Gerardi, MH. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. USA: Wiley-Interscience, 2003.

German Resource Centre for Biological Materials. 1995.
<http://www.dsmz.de/microorganisms/>.

Gottschalk, G. *Bacterial Metabolism*. New York: Springer-Verlag, 1979.

Grant, WD, és PE Long. *Environmental Microbiology*. New York: John Wiley and Sons, 1981.

Guyer, NF. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Sci Technol*, 1982. 15:1457-1461.

Hallenbeck, PC, és JR Benemann. Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy*, 2002. 27:1185-1193.

Harper, SR, és FG Pohland. Enhancement of anaerobic treatment efficiency through process modification. *J Water Poll Control Fed*, 1987. 59:152-161.

Hashsham, SA; Fernandez, AS; Dollhope, SL; Dazzo, FB; Hickley, RF; Tiedje, JM; Criddle, CS. Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66:4050-4057.

Hofman-Bang, J, D Zheng, P Westermann, BK Ahring, és L Raskin. Molecular ecology of anaerobic reactor systems. *Adv Microbiol Eng Biotechnol*, 2003. 81:153-203.

Hormaeche, E, és PR Edwards. A proposed genus *Enterobacter*. *Int Bull Bacteriol Nomen Taxon*, 1960. 10:71-74.

Ivanova, G, G Rákhely, és KL Kovács. Hydrogen production from biopolymers by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and stabilization of the system by immobilization. *Int J Hydrogen Energy*, 2008. in press.

James, A, CAL Chernicharo, és CMM Campos. The development of a new methodology for the assessment of specific methanogenic activity. *Wat Res*, 1990. 24:813-825.

Kalmár, I, KL Kovács, és Z Bagi. Sertés hígrágyára alapozott biogáz referencia üzem. *MTA AMB Kutatási és Fejlesztési Tanácskozása*. Gödöllő, 2003. 2:82-86.

Kaltwasser, BJ. *Biogáz-előállítás és hasznosítás*. Budapest: Műszaki Könyvkiadó, 1983.

Kissné, E Quallich. *A biogáz*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 1983.

Kovács, KL, C Bagyinka, és I Verebély. Eljárás kevert baktériumpopulációt alkalmazó fermentációs rendszer biogázt termelő képességének fokozására. Szabadalom száma: 195978. 1985.

Kovács, KL, és B Polyák. Hydrogenase reactions and utilization of hydrogen in biogas production and microbiological denitrification systems. *Symposium on Gas, Oil, and Enviromental Biotechnology*. Colorado Springs, 1991. 1-16.

Kovács, KL; Kovács, ÁT; Maróti, G; Bagi, Z; Csanádi, G; Perei, K; Bálint, B; BaloghJ; Fülöp, A; Mészáros, LS; Tóth, A; Dávid, R; Latinovics, D; Varga, A; Rákhely, G. Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas production. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2004. 3(3):321-330.

Kovács, KL; Bagyinka, C; Bodrossy, L; Csáki, R; Fodor, B; Györfi, K; Hanczár, T; Kálmán, M; Osz, J; Perei, K; Polyák, B; Rákhely, G; Takács, M; Tóth, A; Tusz, J. Recent advances in biodydrogen research. *Eur J Physiol*, 2000. 439:81-83.

Krylova, NI, PH Janssen, és R Conrad. Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997. 23:107-117.

Leschine, SB. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu Rev Microbiol*, 1995. 49.

Lettinga, G, és AC Haandel. Anaerobic digestion for energy production and environmental protection. *Island Press*, 1993. 817-839.

Lovley, DR, DF Dwyer, és MJ Klug. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1982. 43:1373-1379.

Magalon, A, és A Böck. Analysis of the HypC-HycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *J Biol Chem*, 2000. 275:21114-21120.

Mertoglu, B, B Calli, N Guler, B Inanc, és Y Inoue. Effects of insufficient air injection on methanogenic Archaea in landfill bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 2006. 142:258-265.

Miron, YG, G Zeeman, JB van Lier, és G Lettinga. The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidifacion of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Res*, 2000. 34(5):1705-1713.

Omer, AM. Green energies and the environment. *Ren Sust Energy Rev*, 2006. 12:1789-1821.

Omer, AM. Green energies and the environment. *Ren Sust Energy Rev*, 2006. 12:1789-1821.

Pind, PF, I Angelidaki, és BK Ahring. Dynamics of the anaerobic process: effects of volatile fatty acids. *Biotechnol Bioeng*, 2003. 82(7):791-801.

Rainey, FA; Donnison, AM; JanssenPH; Saul, D; Rodrigo, A; Berquist, PL; Daniel, RM; Stackebrant, E; Morgan, HW. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophylic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiol Lett*, 1994. 120(3):263-266.

Rastogi, G, DR Ranade, TY Yeole, MS Patole, és YS Shouche. Investigation of methanogen population structure in biogas reactor by molecular characterization of methyl-coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes. *Biores Tech*, 2007: 99:5317-5326.

Reeve, J.N. Molecular biology of methanogens. *Annu Rev Microbiol*, 1992. 46.

Sambrook, J, EF Fritsch, és T Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.)*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

Schmidt, JE, és BK Ahring. Effects of hydrogen and formate on the degradation of propionate and butyrate in thermophilic granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl Environ Microbiol*, 1993. 59:2546-2551.

Sharma, YC, B Singh, és SN Upadhyay. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, 2008. 87:2355-2373.

Shima, S, E Warkentin, RK Thauer, és U Ermler. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *J Biosci Bioeng*, 2002. 93:519-530.

Shima, S, E Warkentin, RK Thauer, és U Ermler. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *J Biosci Bioeng*, 2002. 93:519-530.

Thauer, RK. Energy metabolism of methanogenic bacteria. *Bioenerg*, 1990. 1018:256-259.

Thiele, JH, és JG Zeikus. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. *Apl Environ Microbiol*, 1988. 54:20-29.

Thiele, JH, és JG Zeikus. Interactions between hydrogen- and formate-producing bacteria and methanogens during anaerobic digestion. In *Handbook on anaerobic fermentation*, szerző: LE Erickson és DY Fung, 537-547. New York: Marcel Dekker, 1988b.

Thiele, JH, M Chartrain, és JG Zeikus. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 1988. 54:10-19.

van Niel, EW, PAM Claassen, és AJM Stams. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme hyperthermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol Bioeng*, 2003. 81:255-257.

van Niel, EWJ, MAW Buddle, GG de Haas, FJ van der Wal, PAM Claassen, és AJM Sams. Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermothoga elfi*. *Int J Hydrogen Energy*, 2002. 27:1391-1398.

Warren, RAJ. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*, 1996. 50.

Winter, J. Anaerobic waste stabilization. *Biotechnol Adv*, 1984. 2:75-99.

Wolin, MJ. Interspecies hydrogen transfer between H₂-producing and methane-producing species. *Symposium on microbial production and utilization of gases*. Akademie der Wissenschaften, Göttingen, 1975. 141-150.

Wu, WM, RF Hickey, és JG Zeikus. Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1991. 57:3438-3449.

Yadvika, S, TR Sreekrishnan, S Kohli, és V Rana. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - a review. *Biores Technol*, 2004. 95:1-10.

Yin, C, LA Rosendhal, és S Kaer. Grate-firing of biomass for heat and power production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2008. in press.

Zeeman, G, és G Lettinga. The role of anaerobic digestion of domestic sewage in closing the water and nutrient cycle at community level. *Water Sci Technol*, 1999. 39(5):187-194.

Zehnder, ABJ. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York: John Wiley and Sons, 1988.

Zeikus, J.G. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol Rev*, 1977. 41:514-541.

A Ph.D dolgozat összefoglalása

Az anaerob fermentációban szerepet játszó mikroba populációk közötti szoros együttműködés felismerése jelentős előrelépést hozott a biodegradáció folyamatának megértésében. Három fő mikroba csoport játszik szerepet az anaerob lebontási folyamatban, melyek a polimerbontó baktériumok, az acetogén baktériumok, valamint a metanogén törzsek. A polimerbontó törzsek támadják meg a nagymolekulájú szerves vegyületeket extracelluláris enzimeik segítségével, melynek eredményeként oligomer és monomer köztitermékek keletkeznek. Az acetogének elsősorban a cukrokat és oligoszacharidokat hasznosítják, az anyagcsere folyamataik eredményeként szerves savak keletkeznek, mint ecetsav, piroszölősav, hangyasav, propionsav, valamint szén-dioxid. Más acetogén törzsek képesek felhasználni ezeket a szerves savakat például etanolt, hidrogént és szén-dioxidot termelve. A fermentációs folyamat utolsó csoportjaként szereplő metanogén törzsek a szerves savak, hidrogén és szén-dioxid felhasználásával metánt produkálnak. A biogáz fő komponense a metán, egy igen fontos megújuló energiaforrás, főként vidéki és kevésbé fejlett területeken. Az anaerob lebontás szintén kulcsfontosságú technológia az iparosodott területeken képződő nagy mennyiségű biomassza megfelelő kezelésére.

Biogáz fermentáció termodinamikailag csak abban az esetben mehet végbe, ha a hidrogén koncentrációja a rendszerben a küszöbérték alatti, ezért hidrogén a biogázban igen kis mennyiségben van jelen. Ugyanakkor a metanogén törzsek redox reakcióihoz nélkülözhetetlen a megfelelő hidrogén utánpótlás. Az anaerob lebontási folyamatokban szerepet játszó mikrobák közötti szintropikus együttműködés pontos megismerése igen fontos előnyt jelent a biodegradáció folyamatának megértésében. A metanogén és acetogén törzsek szintropikus kölcsönhatásban állnak egymással, mely a sejtek közötti hidrogén transzfer révén valósul meg. A szintropikus partnerek szoros fizikai kapcsolatban állnak egymással, granulátumokat alkotnak a sejtek közötti hidrogén átadás elősegítése érdekében.

A dolgozatomban bemutattam, hogy szignifikáns növekedés tapasztalható a természetes kevert metanogén konzorcium által előállított biogáz mennyiségében, ha a rendszerbe egy megfelelően kiválasztott hidrogén termelő törzset juttatunk be, mely igaz mezofil és termofil hőmérsékletre is. Habár az elképzelés, hogy a hidrogén, mint sebesség meghatározó faktor lehet a rendszerben az eddigi tudásunk alapján igen valószínű, hidrogén termelő baktérium törzs hozzáadását a természetes mikroba konzorciumhoz korábban még nem vizsgálták.

A biogáz fermentációjáért felelős mikroba konzorcium metabolikus folyamatainak pontos részletei nem ismertek, de a jelenlegi tudásunk azt sugallja, hogy a hidrogén lehet a limitáló szubsztrát a metanogének számára. A felismerés abból a tényből következik, hogy míg az acetogén baktériumok igen jó hidrogén termelők a végső termékben, vagyis a biogázban a hidrogén csak nyomokban mutatható ki. A keletkező hidrogént valószínűsíthetően a metanogén mikrobák használják fel.

A lehetséges megfelelő kísérleti módszer annak igazolására, hogy a hidrogén valóban fontos szerepet játszik a metanogének aktivitásában a biogáz fermentációért felelős mikroba konzorcium beoltása egy olyan tiszta kultúrájú baktérium törzssel, mely jó hidrogén termelő aktivitással rendelkezik. Abban az esetben, ha *in situ* hidrogén bevitellel a metanogén törzsek aktivitása fokozható különböző fermentációs hőmérsékleten és különböző szubsztrát biomasszákon bizonyítható, hogy a hidrogén a rendszer egyik kulcsfontosságú limitáló faktora, mivel különböző környezeti feltételek mellett a természetes mikroba konzorcium összetétele eltérő. A számos lehetséges hidrogén termelő törzs közül mezofil hőmérsékleten az *Enterobacter cloacae*-re esett a választásom, míg termofil hőmérsékleten a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*-ra. Az *Enterobacteriaceae* család kiváló hidrogén termelő aktivitással rendelkezik, míg a *C. saccharolyticus*-ra ugyanez mondható el termofil hőmérsékleten, melyhez cellulolitikus aktivitás társul.

Számos kísérleti módszert alkalmaztam annak érdekében, hogy meghatározzam azokat a paramétereket, melyek szerepet játszhatnak a biogáz képződés fokozásában. Az eredmények azt bizonyítják, hogy csak abban az esetben lehetséges az intenzifikáció, ha a biogáz fermentációért felelős konzorcium, valamint a hidrogén termelő törzs szoros kontaktusban áll egymással. Külső forrásból adagolt hidrogén gáz nem volt hatással a fermentációra. Hővel inaktivált, valamint hidrogén termelésre képtelen sejtek (*E. coli hypF* mutáns) szintén hatástalannak bizonyultak.

A dolgozatomban bemutattam, hogy szignifikáns növekedés tapasztalható a kevert metanogén kultúra által előállított biogáz mennyiségében egy megfelelően választott hidrogén termelő törzs hozzáadása segítségével mind mezofil, mind termofil hőmérsékleten. A hatás csak abban az esetben tapasztalható, ha az acetogén és metanogén partnerek szoros kontaktusban állnak egymással. A hatás nem szubsztrát függő, a mérések során számos biomassza típust alkalmaztam, mely eltérő metanogén konzorciumokat feltételez.

A hidrogén termelő törzsek fermentációra gyakorolt pozitív hatását kisüzemi léptékben is megvizsgáltam. Az ismételtsben elvégzett mérés sorozat csaknem 2 évet vett igénybe, mely elegendő idő ahhoz, hogy megvizsgáljam a *C. saccharolyticus* be tud-e

illeszkedni a természetes mikroba konzorciumba, ott fenn tud-e maradni a folyamatos üzem ellenére is. A *C. saccharolyticus* kevert mikroba populációban való kimutatását PCR reakcióval végeztem, melynek kivitelezéséhez két primer párt terveztem. A PCR termékek igazolták, hogy nem volt kimutatható *C. saccharolyticus* DNS a leoltásukat megelőzően a fermentorban, de a beoltást követően, mintegy 4 hónap elteltével is egyértelműen azonosítható volt a törzs. A kísérlet igazolta, hogy a megnövekedett biogáz hozamokért a *C. saccharolyticus* rendszerbe történő bejutásának volt köszönhető.

Meg kell jegyezni, hogy más hidrogén termelő törzsek, mint a Clostridiumok természetes tagjai a biogáz termelő mikroba konzorciumnak. A természetes konzorcium tagjai között előforduló törzsek által termelt hidrogén szintén szubsztrátként szolgálhat a metanogének számára, akárcsak a *C. saccharolyticus* által szolgáltatott hidrogén, azonban a kísérleti rendszeremben molekuláris markerek segítségével a *C. saccharolyticus* egyértelműen azonosítható, így annak viselkedése pontosan nyomon követhető, ellentétben a Clostridiumokkal.

Mezofil rendszerben az *E. cloacae* kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel nehézkes, ugyanis az *Enterobacteriaceae* család egyes tagjai megtalálhatóak a biogáz termelő természetes mikroba konzorciumban, illetve a szubsztrát biomasszában, ezért molekuláris markerek nem használhatóak. Ebben az esetben az *E. coli hypF* mínusz törzsét alkalmaztam, és kimutattam, hogy a biogáz képződésre gyakorolt pozitív hatás csak az aktív hidrogenáz enzimet tartalmazó *Enterobacteriaceae* törzs esetében volt tapasztalható. A *hypF* mutáció blokkolja az aktív hidrogenázok bioszintézisét, de a fermentatív folyamatban szerepet játszó egyéb enzimek funkciójukat lényegében megőrzik. A *hypF* mínusz törzzsel leoltott biogáz fermentorokban nem volt tapasztalható többlet gázhozam a kontrolhoz képest, míg az aktív HypF fehérjét tartalmazó törzs esetében az intenzifikáció megvalósult.

A dolgozatban bemutatott biotechnológiai módszer az anaerob fermentáció során keletkező biogáz mennyiség fokozására ipari léptékben történő alkalmazása során szignifikáns csökkenés következhet be az ipari reaktorok beindítási, felfuttatási, valamint működtetési költségeinek tekintetében.

Summary of the Ph.D. Thesis

Recognition of close syntrophic relationships among the microbe populations, which carry out anaerobic decomposition of biomass, has been fundamental to advances in our understanding of biodegradation. At least three distinct microbe populations participate in the anaerobic digestion process. These are the polymer degrading bacteria, the acetogens, and the methanogens. The polymer degraders attack macromolecules using extracellular enzymes and generate monomeric or oligomeric hydrolytic derivatives. The acetogens then preferentially use the sugars and oligosaccharides for anaerobic fermentation, which yield organic acids, like acetate, succinate, formate, propionate, and carbon dioxide. Other acetogens consume these organic acids, or ethanol, and produce hydrogen and carbon-dioxide. Methanogens constitute the third group. They use acetate, hydrogen, and carbon dioxide to produce methane. Methane is the main component of biogas, an important renewable energy source, particularly in rural or underdeveloped areas. Anaerobic digestion is also a key technology for the treatment of large volumes of biowaste generated in industrialized countries.

Biogas formation is thermodynamically possible when hydrogen is kept below a threshold concentration; thus, hydrogen is barely detectable in biogas. At the same time, the biological activity of methanogens requires a good supply of hydrogen to carry out the redox reaction. The relationship between the acetogens and methanogens is syntrophic, supported by a process called interspecies hydrogen transfer or interspecies electron flow. The syntrophic partners are physically attached to each other, and the microbial consortia tend to form flocs or granules to facilitate interspecies hydrogen transfer.

In my PhD work it has been demonstrated that methanogenesis could be considerably intensified by increasing the hydrogen production capacity of the natural consortium. This was achieved when a suitable hydrogen producing bacterium was added to the anaerobic degradation system. Although the idea that hydrogen availability may be a limiting factor in methanogenesis has been suggested, to the best of our knowledge, adding a proper hydrogen producing strain to the consortium has not been examined and/or exploited in biogas technologies.

Although many of the microbiological details of metabolic networks in a methanogenic consortium are not clear, present knowledge suggests that hydrogen may be a limiting substrate for methanogens. This assumption is based on the fact that acetogenic

bacteria are known hydrogen producers, but there is virtually no hydrogen in the biogas end-product.

An experimental approach to confirm this hypothesis is the inoculation of a natural consortium of biogas-producing microorganisms with a suitable hydrogen producing bacterium strain. The phenomenon should manifest itself under both mesophilic and thermophilic conditions, albeit the microbiological composition of the respective natural microbial consortia would differ. The effect should also be observed when the microorganisms are grown on various substrates. From the numerous potential hydrogen producing candidate strains, *Enterobacter cloacae* was selected at mesophilic temperatures, and *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* turned out to be an outstanding candidate at thermophilic temperatures. Members of the Enterobacteriaceae family are noted for their excellent fermentative hydrogen production capabilities. *C. saccharolyticus* is a Gram-positive thermophilic bacterium, which has an excellent hydrogen producing capacity and also possesses cellulolytic activity.

A set of experiments was designed to identify the parameters, which may be responsible for the increase in biogas formation. These led to the conclusion that the observed intensification effect took place only when the biogas consortium and the hydrogen producing bacteria were in close contact in the same space. Hydrogen administered from outside (either from a gas container or from the head space of a growing *C. saccharolyticus* culture) did not affect the natural biogas formation process. Inactivated hydrogen producing bacteria (*C. saccharolyticus*) and hydrogenase-minus strain (*E. coli*) were ineffective too. I demonstrated that a significant increase in biogas productivity by the mixed methanogenic consortium can be triggered by adding appropriately selected hydrogen producing bacteria to the natural consortium, in either the mesophilic or thermophilic temperature range. Evidence links the effect to the presence and direct contact of living hydrogen producing bacteria with their methanogenic partners. The effect is not particularly substrate dependent. It occurred when various sources of biomass, and therefore various methanogenic consortia were used.

I also established the long-term benefit of the intensification procedure in “real-life” industrial scale-up conditions. Because this was a crucial long-term experiment, it was of particular interest to test if the added *C. saccharolyticus* subsisted and endured the digester environment and prolonged semi-continuous feeding. Two sets of PCR primers were designed to selectively detect *C. saccharolyticus* from the mix of many unknown microbes. The PCR products demonstrated that there was no detectable DNA of *C. saccharolyticus* origin in the pig manure slurry used in the digester, but it was present in the effluent at least 4 months after

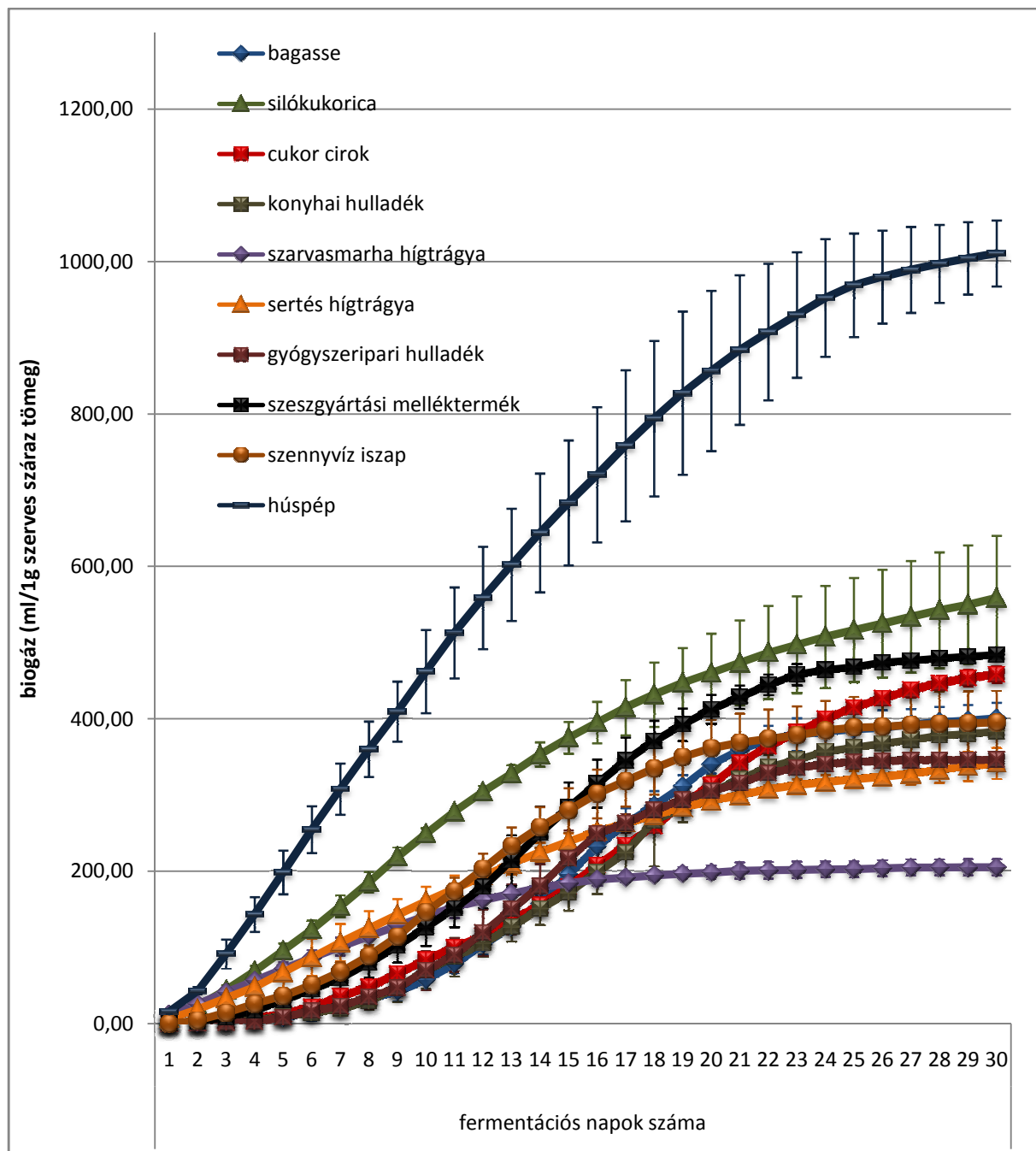
the introduction of its pure culture. This corroborated that the intensification effect could be due to the introduction of *C. saccharolyticus* into the microbiological consortium carrying out anaerobic degradation.

It should be noted that other hydrogen producing bacteria, e.g., Clostridia, are natural members of biogas-producing consortia. These hydrogen producing bacteria would probably be as good hydrogen suppliers for the methanogens as *C. saccharolyticus*, but the experimental advantage of using the latter is the possibility of selective detection with specific molecular biological tools.

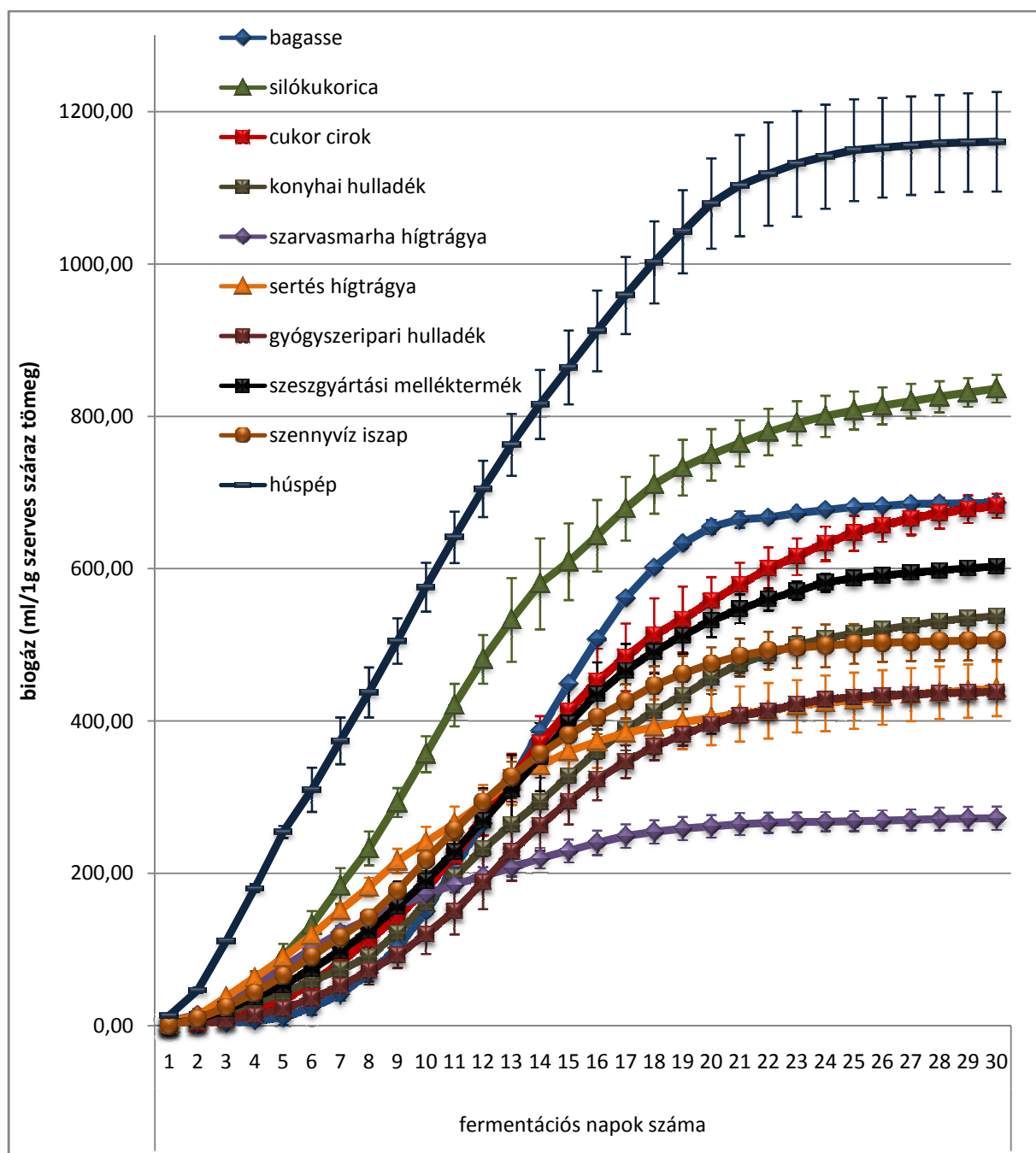
In the mesophilic system, the analysis of the situation was complicated by the fact that members of Enterobacteriaceae are present in the pig manure slurry; therefore, molecular marker signatures cannot be used unambiguously. In this case, the *hypF*-minus *E. coli* mutant strain provided direct evidence, linking the beneficial effect to the presence of an active hydrogen-producing enzyme. Inactivation of the *hypF* gene blocks the biosynthesis of active hydrogenases, but the anaerobic fermentative pathways are unaffected by this mutation. Inoculation with the *hypF*-mutant strain resulted in biogas production levels that matched the controls, whereas inoculation with the strain carrying intact HypF protein and thus active hydrogen producing enzymes produced the intensification effect.

The widespread use of the described method of biotechnological intensification for biogas production can bring about a significant decrease in operational and/or startup costs and will, therefore, contribute to the overall economy of this environmentally friendly, renewable energy production and organic waste disposal technology.

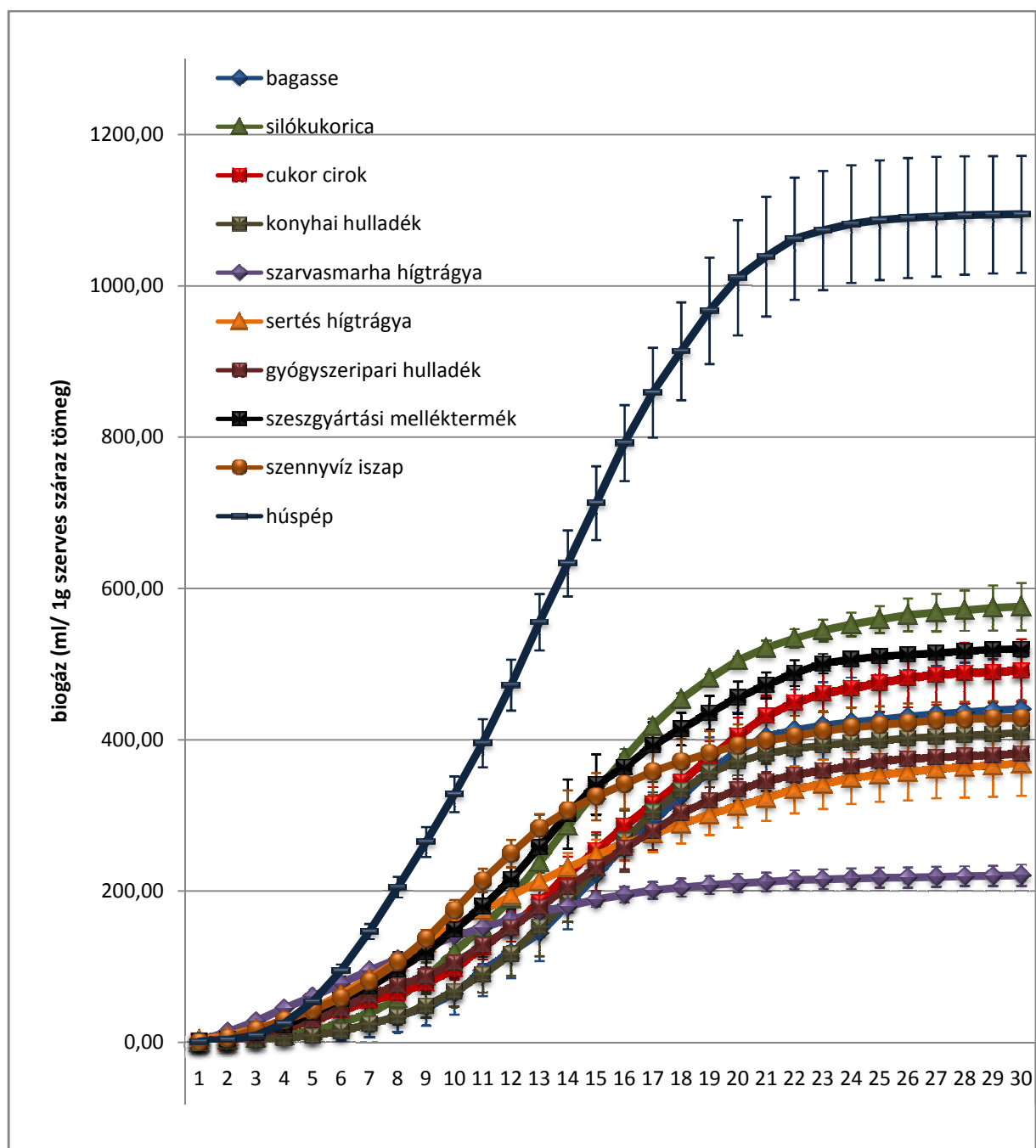
Mellékletek



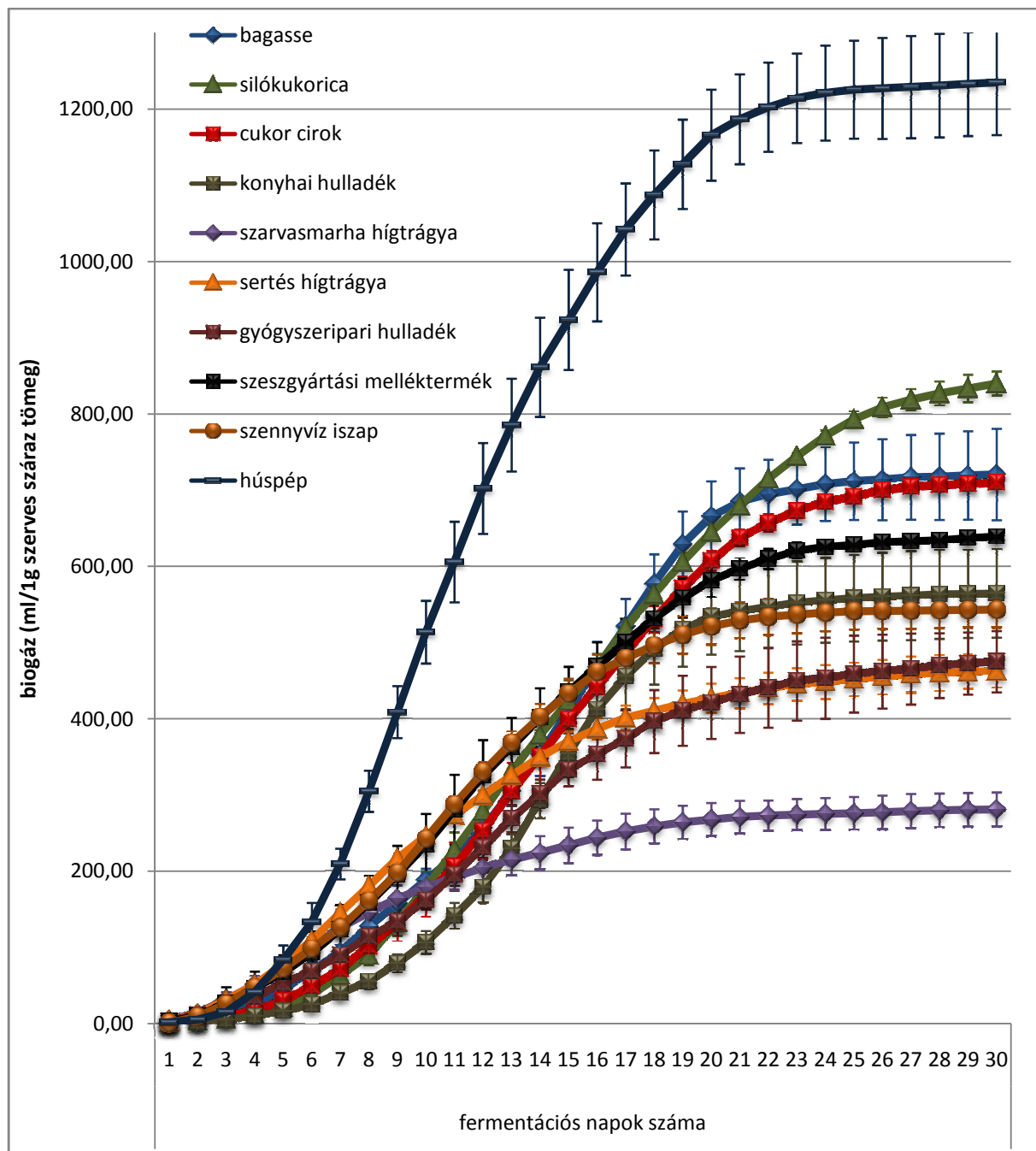
1. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai mezofil hőmérsékleten (kontroll)



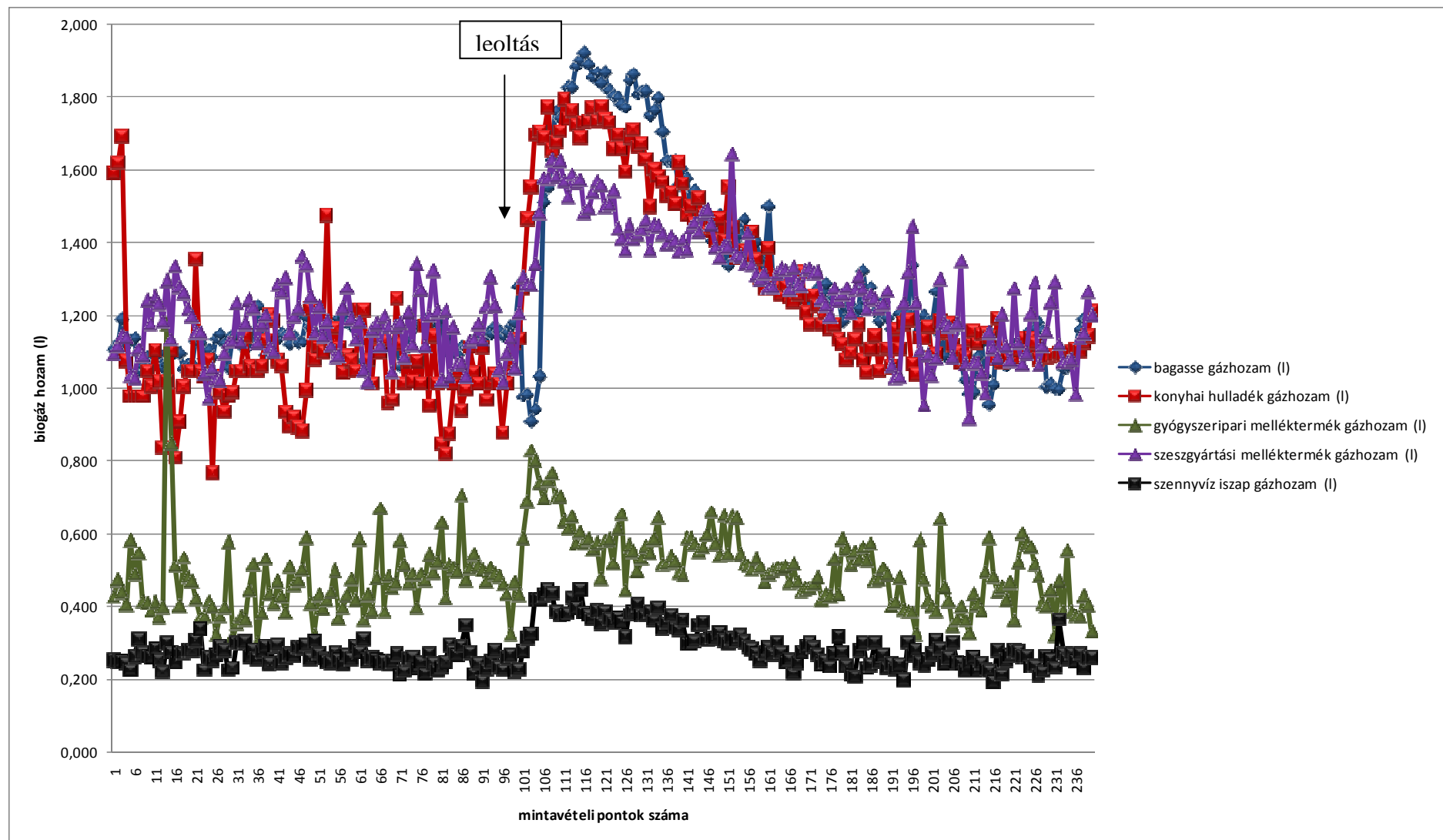
2. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai mezofil hőmérsékleten (hidrogén termelő törzzsel)



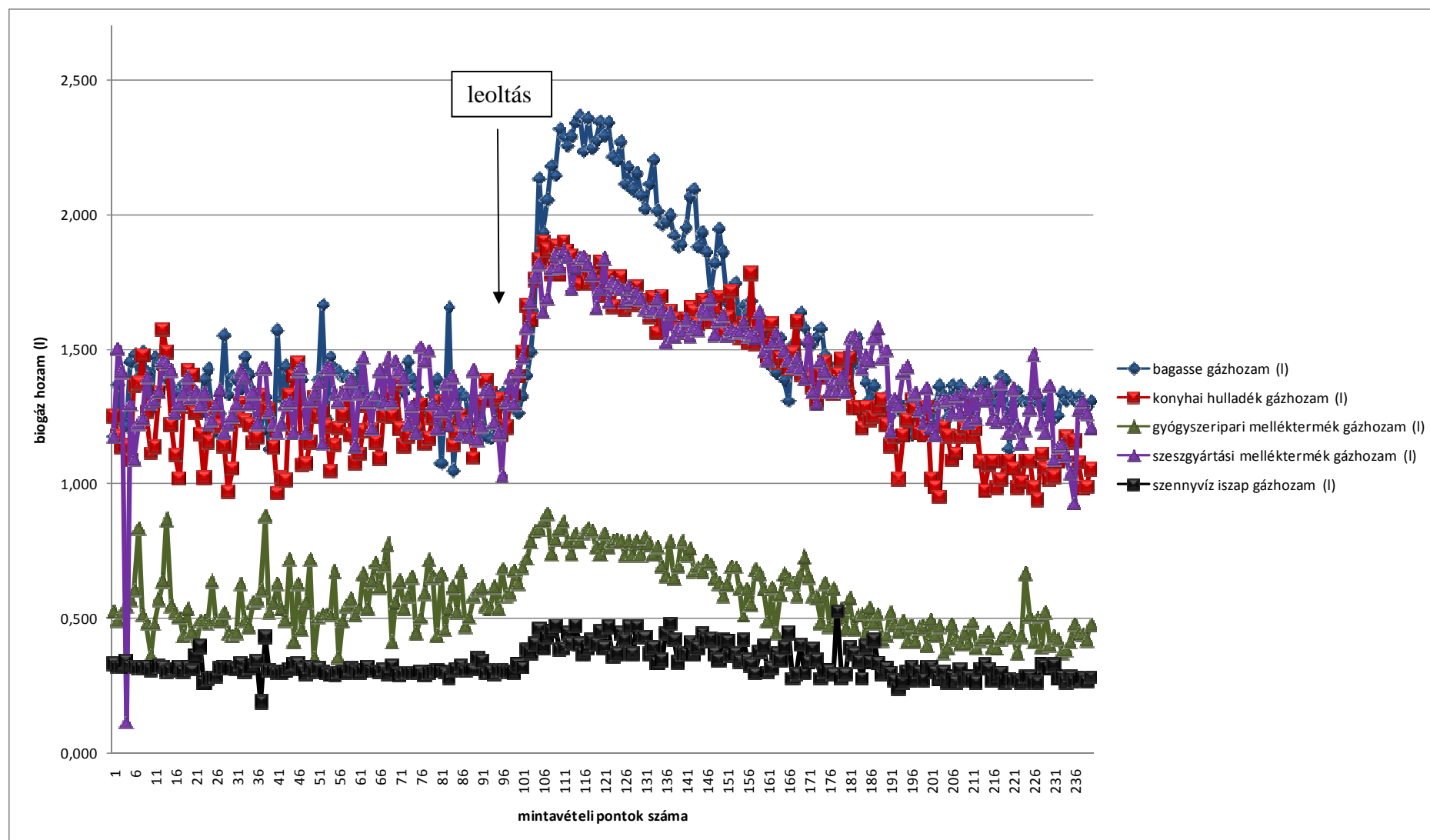
3. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai termofil hőmérsékleten (kontroll)



4. melléklet: Batch fermentációk gázhozamai termofil hőmérsékleten (hidrogén termelő törzzsel)



5. melléklet: Folyamatos üzemű fermentációk gázhozamai mezofil hőmérsékleten



6. melléklet: Folyamatos üzemű fermentációk gázhozam értékei termofil hőmérsékleten